

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035976

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.08

(21) Номер заявки
201590388

(22) Дата подачи заявки
2013.08.15

(51) Int. Cl. A61K 51/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) АНТИ-TAU АНТИТЕЛА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТАУПАТИЙ

(31) 61/683,902; 61/754,085; 61/781,823;
61/813,797; 61/833,355

(32) 2012.08.16; 2013.01.18; 2013.03.14;
2013.04.19; 2013.06.10

(33) US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/US2013/055203

(87) WO 2014/028777 2014.02.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
айПиериан, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Грисволд-Преннер Айрин, Стаглиано
Нэнси Е., Данг Ву (US)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М. (RU)

(56) US-A1-20120087861
WO-A2-2002045743
WO-A2-2005120166

(57) Изобретение относится к анти-Тау антителам для лечения таупатий. Раскрыты фармацевтические композиции, содержащие указанное антитело. Указанные антитела и композиции могут быть использованы для лечения таупатий. Изобретение также раскрывает способы мониторинга прогрессирования таупатий и визуализации обнаружения полипептида Тау в ткани головного мозга человека, включающие использование указанных антител к Тау.

035976 B1

035976 B1

035976

B1

Ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительными заявками на выдачу патента США №№ 61/683902, поданной 16 августа 2012 г., 61/754085, поданной 18 января 2013 г., 61/781823, поданной 14 марта 2013 г., 61/813797, поданной 19 апреля 2013 г., и 61/833355, поданной 10 июня 2013 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Перечень последовательностей предусмотрен в настоящем документе в виде текстового файла, "IPRN-745WO SeqList_ST25.txt", созданного 15 августа 2013 г., и его размер составляет 69 KB. Содержание текстового файла полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Ассоциированный с микротрубочками белок tau распространен в центральной нервной системе и производится главным образом нейронами. Основная функция tau состоит в стабилизации микротрубочек. В головном мозге взрослого человека существуют шесть изоформ tau; изоформы tau представляют собой продукты альтернативного сплайсинга одного гена.

Таупатии представляют собой класс нейродегенеративных заболеваний, являющихся результатом патологической агрегации белка tau в так называемые нейрофибриллярные клубки (NFT) в головном мозге. Некоторые примеры таупатии включают в себя лобно-височную деменцию (FTD), болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию и лобно-височную лобарную дегенерацию.

В настоящей области техники существует потребность в способах лечения таупатий и в реагентах, подходящих для применения в таких способах.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Тау. Настоящее изобретение также включает антитела к Тау и содержащие их композиции для применения в способах.

Настоящее изобретение включает выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау. В некоторых случаях эпитоп не содержит фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях эпитоп не содержит нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или как фосфорилированную аминокислоту, так и нитрованную аминокислоту.

Настоящее изобретение включает выделенное антитело, содержащее:

- a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;
- b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;
- c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;
- d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;
- e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;
- f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;
- g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;
- h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;
- i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;
- j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную по-

следовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

к) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

л) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

м) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

н) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

о) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

р) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

В некоторых случаях константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых случаях область тяжелой цепи относится к изотипу IgG4. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления шарнирная область содержит замену S241P; смотрите, например, Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105. В некоторых случаях антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. В некоторых случаях антитело содержит ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например полимер поли(этиленгликоль). В некоторых случаях антитело слито, напрямую или посредством линкера, с молекулой-носителем, пептидом или белком, который стимулирует пересечение гематоэнцефалического барьера. В некоторых случаях эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау. В некоторых случаях гуманизированная каркасная область легкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, представленных в табл. 3. В некоторых случаях гуманизированная каркасная область тяжелой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, представленных в табл. 2.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую:

а) антитело к Тау согласно настоящему изобретению и

б) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В некоторых случаях антитело инкапсулировано в липосоме. Настоящее изобретение включает рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к Тау согласно настоящему изобретению, причем нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом транскрипционного контроля, который является активным в эукариотической клетке. Настоящее изобретение включает *in vitro* клетку-хозяина, генетически модифицированного с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция может быть заключена в стерильный контейнер. При этом контейнер может представлять собой шприц.

Настоящее изобретение включает применение антитела к Тау согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения таупатии у индивидуума.

В некоторых случаях введение может быть внутривенным. В некоторых случаях введение является интратекальным.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау приводит к изменению в одном или нескольких из следующего: а) количество свободного внеклеточного тау в ткани головного мозга; б) количество свободного внеклеточного тау в интерстициальной жидкости (ISF); в) количество свободного внеклеточного тау в спинномозговой жидкости (CSF); г) межнейронное распространение тау; д) количество внутринейронных тау-агрегатов; е) степень микроглиальной и/или астроцитарной активации; ж) количество фосфорилированного или гиперфосфорилированного тау; з) количество общего тау или свободного тау в ISF или CSF; и) количество внутриклеточных N-концевых тау-фрагментов; к) нейрональная гиперактивность; л) количество A β 40 и/или A β 42 в CSF; м) нагрузка в виде бляшек A β ; н) секреция A β 40 и/или A β 42 из нейрона; о) промоторная активность белка-предшественника амилоида (APP); п) содержание мРНК APP и/или белка APP; р) активность бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояние активации индуцированного A β сигнального пути; г) количество внутриклеточного общего тау или свободного тау; s) количество тау, связанного с антителом к тау, в ISF или CSF и t) количество внутриклеточного тау, связанного с антителом к тау.

Настоящее изобретение включает способ мониторинга прогрессирования таупатии у индивидуума,

причем способ включает: а) определение первого содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума в первый момент времени; б) определение второго содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума во второй момент времени; и с) сравнение второго содержания Тау с первым содержанием Тау, причем указанное определение включает: i) приведение в контакт биологического образца с указанным антителом и ii) количественное определение связывания антитела к полипептиду Тау, присутствующего в образце. В некоторых случаях биологический образец представляет собой спинномозговую жидкость, кровь, плазму, сыворотку, мочу или слюну. В некоторых случаях определенный количественно полипептид Тау представляет собой общий полипептид Тау. В некоторых случаях определенный количественно полипептид Тау представляет собой N-концевой фрагмент полноразмерного полипептида Тау. В некоторых случаях первый момент времени представляет собой момент времени до начала схемы лечения, и второй момент времени представляет собой момент времени после начала схемы лечения. Настоящее изобретение включает способ визуализации для обнаружения полипептида Тау в ткани головного мозга человека *in vivo*, причем способ включает: а) введение индивидууму антитела по любому из пп.1, 5, 16 и 21; и б) обнаружение связывания антитела к полипептиду Тау в ткани головного мозга у индивидуума с применением способа визуализации. В некоторых случаях антитело содержит контрастное средство, подходящее для применения в способе визуализации. В некоторых случаях способ визуализации представляет собой магнитно-резонансную визуализацию или позитронно-эмиссионную томографию.

In vitro способ обнаружения полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума включает: а) приведение в контакт биологического образца с антителом, которое конкурирует за связывание с эпитопом в пределах N-концевой области Тау с антителом, которое содержит: i) определяющие комплементарность области (CDR) легкой цепи антитела, представленные на фиг. 1B; и CDR тяжелой цепи антитела, представленные на фиг. 1A; или ii) CDR легкой цепи антитела, представленные на фиг. 2B; и CDR тяжелой цепи антитела, представленные на фиг. 2A; и б) обнаружение связывания антитела к Тау-полипептиду, присутствующего в образце. В некоторых случаях биологический образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму, мочу, слюну или спинномозговую жидкость. В некоторых случаях предполагается, что индивидуум характеризуется наличием таупатии, у него была диагностирована таупатия, или он характеризуется генетической предрасположенностью к развитию таупатии. В некоторых случаях способ является количественным. В некоторых случаях обнаруженный полипептид Тау представляет собой общий полипептид Тау. В некоторых случаях обнаруженный полипептид Тау представляет собой N-концевой фрагмент полноразмерного полипептида Тау.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A и 1B представлены аминокислотные последовательности IPN001 VH (фиг. 1A) и VL (фиг. 1B). Определяющие комплементарность области (CDR) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фиг. 2A и 2B представлены аминокислотные последовательности IPN002 VH (фиг. 2A) и VL (фиг. 2B). Определяющие комплементарность области (CDR) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фиг. 3A-D изображен эффект антитела к Тау IPN002 на Тау-опосредованную деполяризацию мембраны в кортикальных нейронах.

На фиг. 4A-C изображено аффинное выделение Тау из спинномозговой жидкости (CSF).

На фиг. 5 изображено количественное определение CSF и образцы кондиционированной среды (CM) до и после аффинного выделения Тау.

На фиг. 6A-D представлены аминокислотные последовательности полноразмерного Тау человека.

На фиг. 7 изображено обнаружение фрагментов Тау в кондиционированной среде, в интерстициальной жидкости (ISF) от P301L tau мышей и в CSF от пациентов с PSP и AD.

На фиг. 8A-D изображена индукция гиперактивности кортикальных нейронов внеклеточным фрагментом tau (eTau) (фиг. 8A-C) и снижение индуцированной eTau нейрональной гиперактивности с помощью антитела к Тау IPN001.

На фиг. 9 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта VH 1 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 10 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта VH 2 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 11 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта VH 3 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 12 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта VH 4 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 13 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта Vk 1 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 14 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта Vk 2 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 15 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта

Vk 3 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 16 изображена аминокислотная последовательность гуманизированного IPN002 варианта Vk 4 и нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность.

На фиг. 17 представлена табл. 4, на которой показаны связывающие свойства гуманизированных вариантов IPN-002 с eTau-белками.

На фиг. 18 представлена табл. 5, на которой показаны связывающие свойства гуманизированных вариантов IPN-002 с Tau-383.

На фиг. 19A и 19B изображены свойства гуманизированных вариантов IPN002. На фиг. 19A изображено связывание гуманизированных вариантов IPN-002 с тау, присутствующим в кондиционированных средах iPSC-CN; лизатах iPSC-CN; лизатах головного мозга AD; и лизатах коры головного мозга мыши P301L tau; и лизатах головного мозга яванского макака. На фиг. 19B изображено ингибирование индуцированной eTau нейрональной гиперактивности гуманизированных IPN002 вариантов.

На фиг. 20 изображены аминокислотные последовательности фрагментов eTau в выравнивании с аминокислотной последовательностью фетального тау.

На фиг. 21A-C изображены пролиферативные ответы на гуманизированное антитело к Тау (фиг. 21A), химерное антитело (фиг. 21B) и гуманизированный A33 (фиг. 21C).

На фиг. 22 изображен эффект IPN002 на содержание фосфорилированного Тау *in vivo*.

На фиг. 23 изображено снижение содержаний свободного тау и содержаний общего тау в интерстициальной жидкости (ISF) после лечения с помощью IPN002.

На фиг. 24 изображено снижение содержаний свободного тау в спинномозговой жидкости (CSF) после лечения с помощью IPN002.

На фиг. 25 изображено снижение индуцированной eTau нейрональной гиперактивности с помощью IPN002.

На фиг. 26 изображено присутствие фрагментов Тау в CSF от индивидуумов с вероятной хронической травматической энцефалопатией.

На фиг. 27 изображено связывание гуманизированного варианта IPN002 с синтетическими тау-пептидами с применением анализа в твердой фазе.

На фиг. 28 изображено связывание гуманизированного варианта IPN002 с синтетическими тау-пептидами с применением анализа в жидкой фазе.

На фиг. 29 изображено связывание гуманизированного варианта IPN002 с рекомбинантным Тау и с пептидом PAD.

На фиг. 30 изображена конкуренция небиотинилированных форм синтетических тау-пептидов с биотинилированными формами синтетических тау-пептидов за связывание с гуманизированным вариантом IPN002.

На фиг. 31 изображен эффект введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на показатели поджигания конечностей в баллах в мышинной модели P310L.

На фиг. 32 изображен эффект введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на среднее значение латентного периода в анализе хождения по стержню в мышинной модели P310L.

На фиг. 33 изображен эффект введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на содержание свободного тау (тау, не связанного с антителом к тау) в образцах CSF в мышинной модели P310L.

На фиг. 34 изображено ингибирование антителом индуцированной eTau1a нейрональной гипервозбудимости.

На фиг. 35 изображен эффект полноразмерного, PHF1-реактивного тау или eTau1a на нейрональную гипервозбудимость в кортикальных нейронах *in vitro*.

На фиг. 36 графически изображен эффект полноразмерного, PHF1-реактивного тау или eTau1a на нейрональную гипервозбудимость в кортикальных нейронах *in vitro*.

На фиг. 37 изображен эффект контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на содержание Aβ40 (левая панель) или Aβ42 (правая панель), секретируемого из кортикальных нейронов.

На фиг. 38 изображен эффект контрольного IgG, ингибитора BACE или антител к Тау на содержание Aβ40, секретируемого из первичных кортикальных нейронов.

На фиг. 39 изображен эффект контрольного IgG, ингибитора BACE или антител к Тау на содержание Aβ42, секретируемого из первичных кортикальных нейронов.

На фиг. 40 изображены результаты картирования эпитопов гуманизированного варианта IPN002 (hu-IPN002).

На фиг. 41 изображен анализ для обнаружения различных Тау-полипептидов в CSF.

На фиг. 42 изображено связывание Тау в CSF с помощью IPN002, PHF1 или поликлонального антитела, которое связывает линейный эпитоп в С-концевой части Тау (линейный эпитоп pAb-tau).

На фиг. 43 изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание общего тау в CSF.

На фиг. 44A-H изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на фосфо-Тау AT8 в различных областях и тканях головного мозга.

На фиг. 45А-Е изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание фосфорилированного Тау в различных областях и тканях головного мозга.

На фиг. 46 изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание фосфо-Тау AT8 в гистологическом срезе заднего мозга.

На фиг. 47 изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание фосфо-Тау AT100 в гистологическом срезе заднего мозга.

На фиг. 48А и 48В изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание белка GFAP в гомогенате гиппокампа и в гомогенате коры головного мозга.

На фиг. 49А и 49В изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание белка Iba1 в гомогенате гиппокампа и в гомогенате коры головного мозга.

На фиг. 50А и 50В изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание Aβ40 в гомогенате коры головного мозга и фракции коры S1.

На фиг. 51 изображен эффект лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на процентное отношение мышей, способных пройти испытание прохождения по стержни.

На фиг. 52 изображено связывание hu-IPN002 с различными Тау-пептидами.

На фиг. 53 изображено связывание различных биотинилированных Тау-пептидов с hu-IPN002.

На фиг. 54А и 54В представлены схематические изображения анализов в отношении Тау, не связанного с IPN002 (свободный Тау) (фиг. 54А); и Тау, связанного с IPN002 (связанный Тау) (фиг. 54В).

Определения

Термины "антитела" и "иммуноглобулин" включают в себя антитела или иммуноглобулины любого изотипа, фрагменты антител, которые сохраняют специфическое связывание с антигеном, включая в себя без ограничения фрагменты Fab, Fv, scFv и Fd, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела и слитые белки, содержащие антиген связывающую часть антитела и не относящийся к антителу белок. Антитела могут быть помечены обнаруживаемой меткой, например, с помощью радиоактивного изотопа, фермента, который образует обнаруживаемый продукт, флуоресцентного белка и подобного. Антитела могут быть дополнительно конъюгированы с другими фрагментами, такими как представители пар специфического связывания, например биотин (представитель пары специфического связывания биотин-авидин) и подобным. Антитела также могут быть связаны с твердой подложкой, включая в себя без ограничения полистирольные планшеты или гранулы и подобное. Также под термином подразумеваются Fab', Fv, F(ab')₂ и/или другие фрагменты антител, которые сохраняют специфическое связывание с антигеном, и моноклональные антитела. Антитело может являться моновалентным или бивалентным.

Используемый в настоящем документе термин "гуманизированный иммуноглобулин" относится к иммуноглобулину, содержащему части иммуноглобулинов различного происхождения, причем по меньшей мере одна часть содержит аминокислотные последовательности человеческого происхождения. Например, гуманизированное антитело может содержать части, происходящие из не относящегося к человеку иммуноглобулина с требуемой специфичностью, например мышинового, и из иммуноглобулиновых последовательностей человеческого происхождения (например, химерный иммуноглобулин), соединенные вместе химически с помощью общепринятых техник (например, синтетических) или полученных в виде непрерывного полипептида с применением техник генной инженерии (например, ДНК, кодирующая белковые части химерного антитела, может быть экспрессирована для получения непрерывной полипептидной цепи). Другой пример гуманизированного иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин, содержащий одну или несколько цепей иммуноглобулина, содержащих CDR, происходящую из антитела, не относящегося к человеку, и каркасную область, происходящую из легкой и/или тяжелой цепи человеческого происхождения (например, CDR-привитые антитела с каркасными изменениями или без них). Химерные или CDR-привитые одноцепочечные антитела также предусмотрены под термином гуманизированный иммуноглобулин; смотрите, например, Cabilly et al., патент США № 4816567; Cabilly et al., Европейский патент № 0125023 B1; Boss et al., патент США № 4816397; Boss et al., Европейский патент № 0120694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., Европейский патент № 0194276 B1; Winter, патент США № 5225539; Winter, Европейский патент № 0239400 B1; Padlan, E.A. et al., заявка на выдачу европейского патента № 0519596 A1; смотрите также, Ladner et al., патент США № 4946778; Huston, патент США № 5476786 и Bird, R.E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)), касающиеся одноцепочечных антител.

Например, гуманизированные иммуноглобулины могут быть получены с применением синтетических и/или рекомбинантных нуклеиновых кислот для получения генов (например, κДНК), кодирующих требуемую гуманизированную цепь. Например, последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующие гуманизированные переменные области, могут быть сконструированы с применением способов ПЦР мутагенеза для изменения последовательностей ДНК, кодирующих цепь человека, или гуманизированную цепь, такую как матрицу ДНК из предварительно гуманизированной переменной области (смотрите, 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)). С применением указанных или других подходящих

способов также легко могут быть получены варианты. Например, клонированные переменные области могут быть подвергнуты мутагенезу и могут быть отобраны последовательности, кодирующие варианты с требуемой специфичностью (например, из фаговой библиотеки; смотрите, например, Krebber et al., патент США № 5514548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.)).

"Фрагменты антител" содержат часть интактного антитела, например антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление папаином производит два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, имеющих название фрагменты "Fab", каждый с одним антиген связывающим сайтом, и остаточный фрагмент "Fc", причем аббревиатура отражает способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает в результате фрагмент F(ab')₂, который содержит два антиген-комбинирующих сайта и все еще способен перекрестно сшивать антиген.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания антигена и антигенсвязывающий сайт. Указанная область состоит из димера переменного домена одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной, нековалентной ассоциации. В указанной конфигурации, в которой три CDR каждого переменного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. Обобщенно, шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Тем не менее, даже отдельный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфических для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый связывающий сайт.

Фрагмент "Fab" также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH₁) тяжелой цепи. Фрагменты Fab отличаются от фрагментов Fab' добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH₁ тяжелой цепи, включая в себя один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой в настоящем документе обозначение для Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антител изначально получали в виде пар фрагментов Fab', которые содержат между ними шарнирные цистеины. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) из любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух ясно отличающихся типов, имеющих название каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей на их константных доменах. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Существуют пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

"Одноцепочечные Fv" или "sFv" фрагменты антител содержат домены VH и VL антитела, причем указанные домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который обеспечивает возможность для sFv сформировать требуемую структуру для связывания антигена. Для обзора sFv смотрите Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). Путем применения линкера, который является слишком коротким для обеспечения спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, доменам приходится образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела подробнее описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Используемый в настоящем документе термин "аффинность" относится к равновесной константе для обратимого связывания двух средств (например, антитела и антигена) и выражается как константа диссоциации (K_d). Аффинность может быть по меньшей мере в 1 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 в отношении неродственных аминокислотных последовательностей. Аффинность антитела к целевому белку может составлять, например, от приблизительно 100 до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 пмоль (пМ) или от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 фмоль (фМ) или больше. Используемый в настоящем документе термин "авидность" относится к устойчивости комплекса двух или более средств к диссоциа-

ции после разведения. Термины "иммунореактивный" и "предпочтительно связывает" используются взаимозаменяемо в настоящем документе в отношении антител и/или антигенсвязывающих фрагментов.

Термин "связывание" относится к прямой ассоциации между двумя молекулами вследствие, например, ковалентных, электростатических, гидрофобных и ионных взаимодействий и/или водородных связей, включая в себя такие взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики. Заявленное антитело к Тау связывается специфически с эпитопом в пределах полипептида Тау. Неспецифическое связывание будет относиться к связыванию с аффинностью, составляющей меньше чем приблизительно 10^{-7} М, например связывание с аффинностью, составляющей 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "CDR" или "определяющая комплементарность область" предусмотрен для обозначения несмежных комбинирующих антиген сайтов, обнаруженных в пределах варибельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. CDR были описаны 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); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают в себя перекрывание или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, предусмотрено, что применение любого определения в отношении CDR антитела или привитых антител или их вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в настоящем документе. Аминокислотные остатки, которые включает в себя CDR, определенные каждой из процитированных выше ссылок, представлены ниже в табл. 1 в качестве сравнения.

Таблица 1

Определения CDR

	Kabat ¹ (перечень посл.) ²	Chothia ³	MacCallum ⁴
V _H CDR1	31-35 (31-35)	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65 (50-66)	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102 (99-106)	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34 (24-39)	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56 (55-61)	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97 (94-102)	91-96	89-96

¹Нумерация остатков согласно номенклатуре Kabat et al., ранее.

²Соответствующие остатки согласно нумерации, приведенной в перечне последовательностей.

³Нумерация остатков согласно номенклатуре Chothia et al., ранее.

⁴Нумерация остатков согласно номенклатуре MacCallum et al., ранее.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "каркасный", используемый в отношении варибельной области антитела, означает все аминокислотные остатки за пределами областей CDR в пределах варибельной области антитела. Каркас варибельной области, как правило, представляет собой прерывистую аминокислотную последовательность приблизительно 100-120 аминокислот в длину, но предусмотрено, что это относится только к аминокислотам за пределами CDR. Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "каркасная область" означает каждый домен каркаса, который отделен с помощью CDR.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его природного окружения. Компоненты-примеси его природного окружения представляют собой материалы, которые будут препятствовать диагностическим или терапевтическим применениям антитела, и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело будет очищено (1) до больше чем 90, 95 или 98 мас.% антитела, что определяют по способу Лоури, например больше чем 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с применением додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при восстановительных или невосстановительных условиях с применением кумасси голубого или серебряного красителя. Выделенное антитело включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. В некоторых случаях выделенное антитело будет получено, по меньшей мере, с помощью одной стадии очищения.

Используемые взаимозаменяемо в настоящем документе термины "полипептид", "пептид" и "белок" относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которые могут включать в себя генетически кодированные и не генетически кодированные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, и полипептиды, характеризующиеся модифицированными пептидными остовами. Термин включает в себя слитые белки, включая в себя без ограничения слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слияния с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионин или без них; иммунологически меченые белки; и подобное.

Используемые в настоящем документе термины "лечение" "проведение лечения" и подобное относятся к получению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может

быть профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может являться терапевтическим в отношении частичного или полного излечения заболевания и/или побочного эффекта, приписываемого заболеванию. Используемый в настоящем документе термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает в себя: (а) профилактику возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но которого еще не диагностировали как характеризующегося его наличием; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; и (с) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регрессии заболевания.

Используемые взаимозаменяемо в настоящем документе термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" относятся к млекопитающему, включая в себя без ограничения мышевидных (крысы, мыши), не являющихся людьми приматов, людей, псовых, кошачьих, копытных (например, лошадей, коров, овец, свиней, коз) и т.д.

"Терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству антитела к Тау, которое при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания, является достаточным для осуществления такого лечения для указанного заболевания. "Терапевтически эффективное количество" будет варьировать в зависимости от антитела к Тау, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. подлежащего лечению субъекта.

"Биологический образец" охватывает разнообразие типов образцов, полученных от индивидуума и которые могут быть использованы в диагностическом анализе или анализе-мониторинге. Определение включает в себя кровь и другие образцы жидкостей биологического происхождения, образцы твердых тканей, такие как полученный путем биопсии образец или тканевые культуры или происходящие из них клетки и их потомство. Определение также включает в себя образцы, которые были подвергнуты воздействию любым способом после их получения, например, путем обработки с помощью реагентов, солиubilизации или обогащения в отношении определенных компонентов, таких как полинуклеотиды. Термин "биологический образец" включает в себя клинический образец, а также включает в себя клетки в культуре, клеточные супернантаты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и тканевые образцы. Термин "биологический образец" включает в себя мочу, слюну, спинномозговую жидкость, фракции крови, такие как плазма и сыворотка, и подобное.

Перед тем, как описывать далее настоящее, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, в силу этого, безусловно, может варьировать. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предусмотрена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предусмотрена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если предоставлен диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятых нижней границы, если иное ясно не продиктовано контекстом, между верхней и нижней границей указанного диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в этом установленном диапазоне, включено в настоящее изобретение. Верхние и нижние границы указанных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в настоящее изобретение с условием любой специально исключенной границы в установленном диапазоне. Если установленный диапазон включает в себя одну или обе границы, диапазоны, исключающие любую или обе из указанных включенных границ, также включены в настоящее изобретение.

Если не определено иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины характеризуются тем же значением, которое подразумевает под ними специалист в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы в практическом осуществлении настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в настоящем документе публикации включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если контекст ясно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "гуманизированное антитело к Тау" включает в себя множество таких антител, и ссылка на "таупатию" включает в себя ссылку на одну или несколько таупатий и их эквиваленты, известные специалистам в настоящей области техники, и тому подобное. Следует дополнительно отметить, что пункты формулы изобретения могут быть составлены для исключения какого-либо необязательного элемента. В силу этого, данное утверждение предусмотрено для того, чтобы служить в качестве предшествующего основания для применения такой исключающей терминологии, как "исключительно", "только" и подобного в отношении перечисления заявленных элементов, или применения негативного признака.

Следует понимать, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации в одном варианте осуществления. Напротив, различные признаки настоящего изобретения, которые для

краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к настоящему изобретению, конкретным образом охватываются настоящим изобретением и раскрываются в настоящем документе так, как если бы каждая комбинация в отдельности была отдельно и конкретно раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также конкретным образом охватываются настоящим изобретением и раскрываются в настоящем документе так, как если бы каждая подкомбинация в отдельности была отдельно и конкретно раскрыта в настоящем документе.

Обсуждаемые в настоящем документе публикации предусмотрены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не наделено правом предшествовать такой публикации на основании предшествующего изобретения.

Кроме того, даты предоставленной публикации могут отличаться от действительных дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение включает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Тау. Настоящее изобретение также включает антитела к Тау и содержащие их композиции для применения в способах. Настоящее изобретение дополнительно включает способы обнаружения *in vitro* и *in vivo* с применением описанного в настоящем документе антитела к Тау.

Лечение таупатии.

Настоящее изобретение относится к лечению таупатии. Способы лечения, как правило, включают введение эффективного количества антитела к Тау согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау снижает содержание патологического полипептида Тау в клетке, ткани или жидкости индивидуума и лечит таупатию.

Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленный способ может включать введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества выделенного гуманизированного моноклонального антитела, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело присутствует в фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, например фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, которое является подходящим для введения человеку.

В соответствии с изобретением антитело, которое специфически связывает Тау, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

с) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

д) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

е) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

ф) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

и) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

к) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, пред-

ставленную в SEQ ID NO: 38; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

l) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

m) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

n) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

o) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

p) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело присутствует в фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, например фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, которое является подходящим для введения человеку.

Антитело к Тау согласно настоящему изобретению связывает внеклеточный tau. Используемый в настоящем документе термин "внеклеточный tau" ("eTau") включает в себя любой полипептид Тау, который может быть обнаружен в спинномозговой жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой полипептид, характеризующийся длиной, составляющей 175 аминокислот и содержащий аминокислоты 2-176 полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой полипептид, характеризующийся длиной, составляющей 171 аминокислоту и содержащий аминокислоты 2-172 (SEQ ID NO: 44) полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой eTau-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой eTau-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам осуществления eTau представляет собой eTau-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых случаях полипептид eTau характеризуется длиной, составляющей от приблизительно 50 до приблизительно 175 аминокислот, например от приблизительно 50 аминокислот (aa) до приблизительно 75 aa, от приблизительно 75 до приблизительно 100 aa, от приблизительно 100 до приблизительно 125 aa, от приблизительно 125 до приблизительно 150 aa или от приблизительно 150 до приблизительно 175 aa; и может содержать от 50 до приблизительно 75, от приблизительно 75 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 125, от приблизительно 125 до приблизительно 150 или от приблизительно 150 до приблизительно 175 смежных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного tau. Иллюстративные полипептиды eTau представлены на фиг. 20.

Как описано подробнее ниже, антитело к Тау согласно настоящему изобретению специфически связывает Тау, где связанный антителом эпитоп представляет собой линейный эпитоп, и содержит аминокислотные остатки в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислоты 1-25 Тау, в пределах аминокислоты 1-18 Тау, в пределах аминокислоты 9-18 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау, в пределах аминокислот 15-44 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау. Аминокислотные последовательности изоформ Тау человека представлены на фиг. 6A-D. Аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO:53; смотрите, например, Garcia-Sierra et al. (2003) J. Alzheimer's Disease 5:65; и Horowitz et al. (2004) J. Neurosci. 24:7895. Аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению специфически связывает Тау, где связанный антителом эпитоп представляет собой линейный эпитоп, и содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау согласно настоящему изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау, где эпитоп не включает в себя фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау согласно настоящему изобретению специфически связывает линейный

антитела, представленные на фиг. 2А; и b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, подходящее для введения человеку.

В некоторых случаях способ согласно настоящему изобретению для лечения таупатии включает введение нуждающемуся в этом индивидууму фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело, которое конкурирует за связывание с гуманизированным IPN002 (hu-IPN002) с эпитопом в Тау, который распознается с помощью hu-IPN002 (например, линейный эпитоп в пределах N-концевой части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау, в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау); и b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, подходящее для введения человеку.

IPN001 (в настоящем документе также имеющий название "IPN1" или "IPN-1") и IPN002 (в настоящем документе также имеющий название "IPN2" или "IPN-2") специфически связывают Тау. Эпитоп, связанный IPN001, представляет собой линейный эпитоп и содержит аминокислотные остатки в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау.

В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению, которое является подходящим для применения в способе лечения таупатии, содержит: а) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область легкой цепи; и b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Kabat (смотрите, например, табл. 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 Тау согласно настоящему изобретению, которое является подходящим для применения в способе лечения таупатии, содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Chothia (смотрите, например, табл. 1, выше и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В других случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению, которое является подходящим для применения в способе лечения таупатии, содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN002; и ii) гуманизированную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN002; и ii) гуманизированную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Kabat (смотрите, например, табл. 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 Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, где эпитоп находится в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау, в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN002; и ii) гуманизированную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN002; и ii) гуманизированную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Chothia (смотрите, например, табл. 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В некоторых случаях способ согласно настоящему изобретению для лечения таупатии включает введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: а) антитело, которое специфически связывает линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)), где антитело содержит: (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (v) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, подходящее для введения человеку.

Аминокислотные последовательности VH и VL IPN001 представлены на фиг. 1А и 1В. CDR (определенные согласно Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Аминокислотные последовательности VH и VL из IPN002 представлены на фиг. 2А и 2В. CDR (определенные согласно Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

SEQ ID NO:1-12 являются следующими:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);
 KVSkrFS (SEQ ID NO:2);
 FQGSLVPA (SEQ ID NO:3);
 SYGMS (SEQ ID NO:4);
 TISSSGSRTYFPDSVKG (SEQ ID NO:5);
 TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);
 KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);
 KVSnrFS (SEQ ID NO:8);
 FQGSLVPA (SEQ ID NO:9);
 KYGMS (SEQ ID NO:10);
 TISSSGSRTYYPDSVKG (SEQ ID NO:11);
 SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

В некоторых случаях антитело содержит гуманизованную каркасную область легкой цепи и/или гуманизованную каркасную область тяжелой цепи. Гуманизованные антитела к Тау описаны подробно ниже.

Таупатия представляет собой нарушение, характеризующееся аномальным содержанием Тау в клетке, ткани или жидкости у индивидуума. В некоторых случаях таупатия характеризуется присутствием в клетке, ткани или жидкости повышенных (выше чем нормальные) содержаний Тау или полипептидов Тау и/или патологических форм Тау. Например, в некоторых случаях таупатия характеризуется присутствием в ткани головного мозга и/или спинномозговой жидкости повышенных содержаний Тау или полипептидов Тау и/или патологических форм Тау. "Выше чем нормальное" содержание Тау в клетке, ткани или жидкости указывает на то, что содержание Тау в ткани или жидкости является выше нормального контрольного содержания, например выше нормального контрольного содержания для индивидуума или популяции индивидуумов одной возрастной группы; смотрите, например, Blomberg et al. (2001) "Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals" *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12:127. В некоторых случаях индивидуум, характеризующийся таупатией, проявляет один или несколько дополнительных симптомов таупатии (например, снижение когнитивных способностей).

В других случаях таупатия характеризуется присутствием в клетке, ткани или жидкости содержаний Тау, которые являются ниже нормального. "Ниже чем нормальное" содержание Тау в ткани или жидкости указывает на то, что содержание Тау в клетке, ткани или жидкости является ниже нормального контрольного содержания, например ниже нормального контрольного содержания для индивидуума или популяции индивидуумов одинаковой возрастной группы.

Болезнь Альцгеймера и определенные формы лобно-височной деменции (болезнь Пика, спорадическая лобно-височная деменция и лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17) являются наиболее распространенными формами таупатии. Настоящее изобретение включает описанный выше способ лечения, причем таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, спорадическую лобно-височную деменцию и лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17. Другие таупатии включают в себя без ограничения прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и подострый склерозирующий панэнцефалит.

Нейродегенеративная таупатия включает в себя следующее: болезнь Альцгеймера, комплекс боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменция, характеризующаяся аргирофильными гранулами деменция, амилоидная ангиопатия британского типа, церебральная амилоидная ангиопатия, кортикобазальная дегенерация, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, деменция боксеров, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височная деменция (FTD), лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, лобно-височная лобарная дегенерация, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественная системная атрофия, миотоническая дистрофия, болезнь Ниманна-Пика типа С, не относящееся к болезни Гуам заболевание двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитный паркинсонизм, прион-церебральная амилоидная ангиопатия, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, мультиинфарктная деменция, ишемический инсульт, хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), травматическое повреждение головного мозга (ТБИ) и инсульт.

Настоящее изобретение также включает способы лечения синуклеинопатии, например болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т.д. Например, PD с деменцией (PDD) можно лечить с помощью заявленного способа.

Согласно одному варианту осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению предотвращает или замедляет возникновение по меньшей мере одного симптома нейродегенеративной тау-

патии у субъекта. Согласно одному варианту осуществления заявленное антитело к Тау снижает или устраняет по меньшей мере один симптом нейродегенеративной таупатии у субъекта. Симптом может представлять собой формирование одного или нескольких отложений патологического tau; внеклеточный растворимый Тау и/или фрагменты Тау; отложения гиперфосфорилированного tau; отложения нерастворимого tau; нейрофибриллярные клубки; нейрофибриллярные волокна; предшествующие клубкам агрегаты фосфо-tau; внутринейрональные нейрофибриллярные клубки; нейрональную гиперактивность; и вненейрональные нейрофибриллярные клубки в головном мозге или спинном мозге субъекта. Симптом может представлять собой неврологический симптом, например нарушенная когнитивная функция, нарушение памяти, потеря двигательной функции и т.д. В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению может улучшать когнитивную функцию. В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению может снижать скорость снижения когнитивной функции. В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению может улучшать двигательную функцию. В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению может снижать скорость снижения когнитивной функции.

Симптом также может представлять собой содержание полипептида Тау в CSF индивидуума. Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело к Тау при введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или в комбинированной терапии индивидууму, характеризующемуся наличием таупатии, снижает содержание полипептида Тау в CSF индивидуума по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 15, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 30, по меньшей мере приблизительно на 40, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем на 50% по сравнению с содержанием полипептида Тау в CSF индивидуума до лечения с помощью антитела к Тау.

Введение заявленного антитела к Тау индивидууму может приводить к одному или нескольким из следующего: снижение количества свободного внеклеточного Тау в ткани головного мозга; снижение межклеточного распространения (например, межнейронного распространения) Тау (например, фрагментов Тау); снижение количества агрегатов Тау (например, внутриклеточных (например, внутринейрональных) агрегатов tau); снижение количества нейрофибриллярных клубков в ткани головного мозга; снижение уровня микроглиальной активации и/или астроцитарной активации; снижение количества фосфорилированного tau; снижение количества гиперфосфорилированного tau; снижение общего Тау (например, общего внутриклеточного Тау; и/или общего внеклеточного Тау); снижение свободного Тау (например, Тау, который не связан с заявленным антителом к Тау); снижение нейрональной гиперактивности; и снижение количества N-концевых фрагментов Тау. "Общий Тау" может включать в себя сумму общего полноразмерного Тау любой изоформы; и любые N-концевые фрагменты Тау, которые присутствуют и которые проявляют эпитоп, распознаваемый заявленным антителом к Тау. Аминокислотные последовательности полноразмерного Тау человека представлены на фиг. 6A-D. Снижение фосфорилированного Тау можно определить с применением любого известного способа, например иммунологического способа с применением антитела к фосфо-Тау.

Введение заявленного антитела к Тау индивидууму может приводить к изменению одного или нескольких из следующего: а) количество свободного внеклеточного tau в ткани головного мозга; b) количество свободного внеклеточного tau в интерстициальной жидкости (ISF); c) количество свободного внеклеточного tau в спинномозговой жидкости (CSF); d) межнейронное распространение tau; e) количество внутринейронных агрегатов tau; f) степень микроглиальной и/или астроцитарной активации; g) количество фосфорилированного или гиперфосфорилированного tau; h) количество общего Тау или свободного tau в ISF или CSF; i) количество внутриклеточных N-концевых фрагментов tau; j) нейрональная гиперактивность; k) количество A β 40 и/или A β 42 в CSF; l) нагрузка в виде бляшек A β ; m) секреция A β 40 и/или A β 42 из нейрона; n) промоторная активность белка-предшественника амилоида (APP); o) содержание мРНК и/или белка APP; p) активность бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояние активации индуцированного A β сигнального пути; r) количество внутриклеточного общего tau или свободного tau; s) количество tau, связанного с антителом к Тау в ISF или CSF; и t) количество внутриклеточного tau, связанного с антителом к Тау.

Введение заявленного антитела к Тау индивидууму может в некоторых случаях улучшать когнитивную функцию у индивидуума или, по меньшей мере, уменьшать скорость снижения когнитивной функции у индивидуума.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает количество свободного внеклеточного полипептида Тау (например, количество свободного внеклеточного полипептида Тау в ткани головного мозга) по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем на 50% по сравнению с количеством свободного внеклеточного полипептида Тау у индивидуума до введения антитела к Тау.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает межклеточное (например, межнейронное) распространение полипептида Тау (например, патологического полипептида

Тау) по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем на 50% по сравнению с межклеточным распространением до введения заявленного антитела к Тау.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает количество агрегатов Тау (например, внутриклеточных (например, внутринейрональных) агрегатов тау) по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем на 50% по сравнению с количеством агрегатов Тау до введения заявленного антитела к Тау.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает нейротоксичность у индивидуума; и/или снижает нейровоспаление у индивидуума; и/или снижает активацию астроцитов и микроглии; и/или снижает индукцию патологических электрофизиологических эффектов; и/или снижает количество Тау в экзосомах.

В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает нейрональную гиперактивность по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем на 50% по сравнению с уровнем степени нейрональной гиперактивности до введения заявленного антитела к Тау. В некоторых случаях введение заявленного антитела к Тау индивидууму снижает нейрональную гиперактивность по меньшей мере приблизительно на 10, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 25, по меньшей мере приблизительно на 50 или больше чем 50%, что определяют с помощью точечной фиксации потенциала нейрона на целой клетке; например, точечной фиксации потенциала на целой клетке происходящего из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки кортикального нейрона (iPSC-CN) или культуры кортикальных нейронов человек (HCC).

Введение подходящих композиций можно осуществить различными путями, например путем внутривенного, интраперитонеального, подкожного, интракраниального, интратекального, например, через сонную артерию), внутримышечного, интраназального, местного или интрадермального введения или доставки в спинной или головной мозг. Аэрозольные составы, такие как составы назального спрея, включают в себя очищенные водные или другие растворы активного средства с консервантами и изотоническими средствами. Такие составы доводят до pH и изотонического состояния, совместимого со слизистыми оболочками носовой полости.

В некоторых случаях заявленное антитело к Тау модифицировано или составлено таким образом, чтобы обеспечивать способность антитела пересекать гематоэнцефалический барьер. Такое антитело или композиция антител могут быть введены индивидууму с таупатией с помощью различных энтеральных и парентеральных путей введения, включая в себя пероральный, внутривенный путь и т.д.

Препараты для парентерального введения включают в себя стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей представляют собой пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, такие растительные масла, как оливковое масло, и такие органические сложные эфиры для инъекций, как этилолеат. Водные носители включают в себя воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая в себя солевые и буферные среды. Парентеральные инертные носители включают в себя раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Внутривенные инертные носители включают в себя жидкие и питательные наполнители, электролитные наполнители (такие как наполнители на основе декстрозы Рингера) и подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и подобное. Более того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать такие дополнительные средства, как дофамин или психофармакологические лекарственные средства в зависимости от предусмотренного применения фармацевтической композиции.

Схема дозирования будет определяться лечащим врачом или другим медицинским персоналом на основании различных клинических факторов. Как хорошо известно в медицинской области техники, дозировки для любого пациента зависят от различных факторов, включая в себя параметры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимы одновременно. Доза заявленного антитела к Тау может находиться, например, в диапазоне 0,001-1000 мкг; тем не менее, предусмотрены дозы ниже или выше указанного иллюстративного диапазона, особенно принимая во внимание вышеупомянутые факторы. Как правило, дозировка может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг или от приблизительно 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела индивидуума. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах диапазона 1-10 или по меньшей мере 1 мг/кг. Предусмотрено, что промежуточные дозы в указанных выше диапазонах также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Субъектам могут вводить такие дозы ежедневно, через день, каждую неделю или согласно любой другой схеме, определенной путем эмпирического анализа. Иллюстративное лечение включает введение в множественных дозировках в течение пролонгированного периода, например в течение по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные схема лечения включают введение один раз каж-

дые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Иллюстративные схемы дозирования включают в себя 1-10 или 15 мг/кг каждый день, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг раз в неделю. В некоторых способах два или больше моноклональных антител с различными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае дозировка каждого вводимого антитела попадает в пределы указанных диапазонов. Прогресс можно подвергать мониторингу путем периодической оценки.

Комбинированная терапия.

Антитело к Тау согласно настоящему изобретению может быть введено нуждающемуся в этом индивидууму отдельно (например, в виде монотерапии) или в комбинированной терапии с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

Для лечения AD подходящие дополнительные терапевтические средства включают в себя без ограничения ингибиторы ацетилхолинэстеразы, включая в себя без ограничения Agicept (донепезил), Exelon (ривастигмин), метрифонат и такрин (Cognex); антитело к A β ; нестероидные противовоспалительные средства, включая в себя без ограничения ибупрофен и индометацин; такие ингибиторы циклооксигеназы-2 (Cox2) как Celebrex; и такие ингибиторы моноаминоксидазы, как селегилин (Eldepryl или Deprenyl). Дозировки для каждого из описанных выше средств известны в настоящей области техники.

Другое подходящее дополнительное терапевтическое средство в лечении AD представляет собой средство, которое ингибирует агрегацию tau, например производное нафтохинона, которое ингибирует агрегацию tau, как описано в патенте США № 7605179. Другое подходящее дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое ингибирует фосфорилирование Тау, например 3-замещенное-4-пиримидиновое производное, которое ингибирует tau протеинкиназу 1, как описано в патенте США № 7572793.

Используемое в настоящем документе выражение "в комбинации с" относится к применениям, где, например, первое соединение вводят в течение полного курса введения второго соединения; где первое соединение вводят в течение периода времени, который перекрывается с введением второго соединения, например, где введение первого соединения начинается до введения второго соединения, и введение первого соединения заканчивается до окончания введения второго соединения; где введение второго соединения начинается до введения первого соединения, и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; где введение первого соединения начинается до начала введения второго соединения, и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; где введение второго соединения начинается до начала введения первого соединения, и введение первого соединения заканчивается до окончания введения второго соединения. В связи с этим, выражение "в комбинации" также может относиться к режиму, включающему введение двух или более соединений. Используемое в настоящем документе выражение "в комбинации с" также относится к введению двух или более соединений, которые могут быть введены в одном и том же составе или различных составах, одинаковым путем или различными путями и в одинаковом типе лекарственной формы или различных типах лекарственных форм.

Подлежащие лечению индивидуумы.

Индивидуумы, подходящие для лечения с помощью заявленного антитела к Тау, включают в себя индивидуумов, у которых диагностировали таупатию; индивидуумов с повышенным риском развития таупатии, чем общая популяция (например, индивидуумов, характеризующихся генетической предрасположенностью к развитию таупатии); индивидуумов с PDD и подобных. В некоторых случаях индивидуум представляет собой взрослого человека. В некоторых случаях взрослый человек характеризуется возрастом, составляющим 30, 40, 50, 60, 70 или 80 лет или старше. Например, взрослый человек может характеризоваться возрастом от 40 до 50 лет, от 50 до 60 лет, от 60 до 70 лет или старше чем 70 лет.

Способы снижения содержаний A β 40 и A β 42.

Настоящее изобретение включает способ снижения содержания A β 40 и/или A β 42 в нейрональной клетке и/или внеклеточной жидкости у индивидуума. Способ, как правило, включает введение индивидууму: а) эффективного количества гуманизированного антитела, которое связывает N-концевую область полипептида Тау; или б) фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело.

Гуманизированное антитело, которое связывает N-концевую область полипептида Тау и которое является подходящим для применения в заявленном способе снижения A β 40 и A β 42 в нейрональной клетке и/или внеклеточной жидкости, представляет собой гуманизированное антитело, которое связывает эпитоп Тау, который находится в пределах аминокислот 2-176 Тау, 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 Тау. Иллюстративные полипептиды Тау представлены на фиг. 20; антитело, которое снижает содержание A β 40 и/или A β 42 в нейрональной клетке и/или внеклеточной жидкости у индивидуума, может представлять собой гуманизированное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, представленном на фиг. 20.

В некоторых случаях антитело, которое снижает содержание A β 40 и/или A β 42 в нейрональной

клетке и/или внеклеточной жидкости у индивидуума и которое является подходящим для применения в заявленном способе, представляет собой гуманизированное антитело к Тау согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело представляет собой гуманизированное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау.

Антитела к Тау.

Настоящее изобретение включает выделенные антитела к Тау и содержащие их фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение включает выделенное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах N-концевой области полипептида Тау (например, линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)).

В некоторых случаях антитело является гуманизированным, например одна или несколько каркасных областей переменной области тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи включают в себя последовательности, происходящие из каркаса иммуноглобулина человека.

Настоящее изобретение включает выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау. В некоторых случаях эпитоп не содержит фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях эпитоп не содержит нитрованную аминокислоту. В некоторых случаях эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или как фосфорилированную аминокислоту, так и нитрованную аминокислоту.

Гуманизация каркасной(ых) области(ей) снижает риск антитела, вызывающего ответ человеческого антитела на мышиное антитело (НАМА) у людей. Установленные в настоящей области техники способы определения иммунного ответа могут быть проведены для мониторинга ответа НАМА у конкретного пациента или во время клинических испытаний. У пациентов, которым вводят гуманизированные антитела, можно провести оценку иммуногенности в начале и в течение введения терапевтического средства. Ответ НАМА измеряют, например, путем обнаружения антител к гуманизированному терапевтическому реагенту, в образцах сыворотки от пациента с применением способа, известного специалисту в настоящей области техники, включая в себя технологию поверхностного плазменного резонанса (BIAcore) и/или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Во многих случаях заявленное гуманизированное антитело к Тау, по существу, не вызывает ответ НАМА у субъекта-человека. В некоторых случаях заявленное гуманизированное антитело к Тау характеризуется пониженным иммуногенным потенциалом, что определяют с помощью анализа EpiScreen™, проведенного с применением истощенных по CD8⁺ мононуклеаров периферической крови. В некоторых случаях заявленное гуманизированное антитело к Тау проявляет индекс стимуляции, составляющий меньше чем 2,0.

Определенные аминокислоты из каркасных остатков переменной области человека выбирают для замены на основании их возможного воздействия на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Неестественное соседство областей CDR мыши с переменной каркасной областью человека может приводить к неестественным конформационным ограничениям, которые, если не будут откорректированы с помощью замены определенных аминокислотных остатков, приводят к потере аффинности связывания.

Выбор аминокислотных остатков для замены можно определить частично с помощью компьютерного моделирования. Компьютерное аппаратное и программное обеспечение для получения трехмерных изображений иммуноглобулиновых молекул известно в настоящей области техники. Как правило, молекулярные модели получают, начиная с выясненных структур для иммуноглобулиновых цепей или их доменов. Цепи, подлежащие моделированию, сравнивают в отношении сходства аминокислотной последовательности с цепями или доменами выясненных трехмерных структур, и цепи или домены, показывающее самое высокое сходство последовательностей выбирают в качестве исходных точек для конструкции молекулярной модели. Цепи или домены, характеризующиеся по меньшей мере 50% идентичностью последовательности, выбирают для моделирования, например, цепи, характеризующиеся по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или больше чем 90% идентичностью последовательности или больше выбирают для моделирования. Выясненные исходные структуры модифицируют для обеспечения различий между фактическими аминокислотами в иммуноглобулиновых цепях или доменах, подлежащих моделированию, и иммуноглобулиновых цепях или доменах в исходной структуре. Модифицированные структуры затем подвергают сборке в составной иммуноглобулин. В итоге, модель уточняют путем минимизации энергии и путем подтверждения того, что все атомы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга и что длины и углы связей находятся в пределах химически допустимых границ.

CDR и каркасные области определены согласно Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991). Альтернативное структурное определение было предложено Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); *Nature* 342:878 (1989) и *J. Mol. Biol.* 186:651 (1989) (обобщенно имеющее название "Chothia"). Если каркасные остатки, определенные согласно Kabat,

ранее, составляют структурные остатки петли, определенные согласно Chothia, ранее, аминокислоты, присутствующие в мышинном антителе, могут быть выбраны для замены в гуманизированном антителе. Остатки, которые являются "смежными с областью CDR", включают в себя аминокислотные остатки в положениях, непосредственно прилежащих к одной или нескольким CDR в первичной последовательности гуманизированной цепи иммуноглобулина, например в положениях, непосредственно прилежащих к CDR, определенной согласно Kabat, или CDR, определенной согласно Chothia (смотрите, например, Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987)). Указанные аминокислоты наиболее вероятно провзаимодействуют с аминокислотами в CDR и, если их выбирают из акцептора, деформируют донорную CDR и снижат аффинность. Более того, смежные аминокислоты могут взаимодействовать напрямую с антигеном (Amit et al., Science, 233:747 (1986)) и выбор указанных аминокислот из донора может быть желательным для сохранения всех антигенных контактов, которые обеспечивают аффинность в исходном антителе.

Настоящее изобретение включает выделенное антитело, содержащее гуманизированную каркасную область легкой цепи и гуманизированную каркасную область тяжелой цепи, причем выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида Тау с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи присутствуют в отдельных полипептидах. В других случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи присутствуют в одном полипептиде. Выделенное антитело может включать в себя тяжелую цепь, которая содержит константную область изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В других случаях антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. Антитело может содержать ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например, где синтетический полимер представляет собой полимер поли(этиленгликоль). В некоторых случаях выделенное антитело слито, напрямую или посредством линкера, с молекулой-носителем, пептидом или белком, который стимулирует пересечение гематоэнцефалического барьера. В некоторых случаях связанный выделенным антителом эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау. Гуманизированная каркасная область легкой цепи выделенного антитела может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, представленных в табл. 3. Гуманизированная каркасная область тяжелой цепи выделенного антитела содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, представленных в табл. 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR) антитела IPN001, где CDR определены согласно Kabat (смотрите, например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область легкой цепи; и б) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN001; и ii) гуманизированную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Kabat (смотрите, например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)). Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления антитело к Тау включает в себя гуманизированную каркасную область VH и/или VL.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в

пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN001; и ii) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN001; и ii) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Chothia (смотрите, например, табл. 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN002; и ii) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN002; и ii) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Kabat (смотрите, например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VL антитела IPN002; и ii) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR VH антитела IPN002; и ii) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи; где CDR VH и CDR VL определены согласно Chothia (смотрите, например, табл. 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и ii) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR, выбранные из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; и ii) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к Тау согласно настоящему изобретению (например, заявленное антитело, которое специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау, например линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот 9-18 Тау (где аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO:53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (где аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO:51)) содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR, выбранные из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; и ii) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: i) одну, две или три CDR, выбранные из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и ii) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи.

В некоторых случаях антитело содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и (iv) гуманизованную каркасную область легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и (iv) гуманизованную каркасную область тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело к Тау содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну, две или три CDR тяжелой цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

кислотной последовательностью, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 4, 5 и 6; и одну, две, три или четыре области FR, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит, в направлении от N-конца к С-концу: гуманизованную FR1 тяжелой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; гуманизованную FR2 тяжелой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; гуманизованную FR3 тяжелой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и гуманизованную FR4 тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело к Тау содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую одну, две или три CDR легкой цепи, характеризующиеся полипептидной последовательностью, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 1, 2 и 3; и одну, две, три или четыре области FR, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит, в направлении от N-конца к С-концу: гуманизованную FR1 легкой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; гуманизованную FR2 легкой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; гуманизованную FR3 легкой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и гуманизованную FR4 легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело к Тау содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну, две или три CDR тяжелой цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 10, 11 и 12; и одну, две, три или четыре области FR, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит, в направлении от N-конца к С-концу: гуманизованную FR1 тяжелой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; гуманизованную FR2 тяжелой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; гуманизованную FR3 тяжелой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и гуманизованную FR4 тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело к Тау содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую одну, две или три CDR легкой цепи, характеризующиеся полипептидной последовательностью, выбранной из одной или нескольких из SEQ ID NO: 7, 8 и 9; и одну, две, три или четыре области FR, которые являются гуманизированными. Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит, в направлении от N-конца к С-концу: гуманизованную FR1 легкой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; гуманизованную FR2 легкой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; гуманизованную FR3 легкой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и гуманизованную FR4 легкой цепи.

Аминокислотные последовательности VH и VL IPN001 представлены на фиг. 1A и 1B. CDR (определенные согласно Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Аминокислотные последовательности VH и VL IPN002 представлены на фиг. 2A и 2B. CDR (определенные согласно Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

SEQ ID NO:1-12 являются следующими:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);
 KVS KRFS (SEQ ID NO:2);
 FQGSLPWA (SEQ ID NO:3);
 SYGMS (SEQ ID NO:4);
 TISSSGSRTYFPDSVKG (SEQ ID NO:5);
 TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);
 KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);
 KVS NRFS (SEQ ID NO:8);
 FQGSLPWA (SEQ ID NO:9);
 KYGMS (SEQ ID NO:10);
 TISSSGSRTYYPDSVKG (SEQ ID NO:11);
 SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 1B и представленной в SEQ ID NO: 13.

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 1А и представленной в SEQ ID NO: 14.

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 2В и представленной в SEQ ID NO: 15.

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 2А и представленной в SEQ ID NO: 16.

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 9 (вариант VH 1).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 10 (вариант VH 2).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 11 (вариант VH 3).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 12 (вариант VH 4).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 13 (вариант Vk 1).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 14 (вариант Vk 2).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 15 (вариант Vk 3).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, представленной на фиг. 16 (вариант Vk 4).

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 каркасных (FR) аминокислотных замен относительно аминокислотных последовательностей FR исходного антитела IPN002, представленных в табл. 2.

Таблица 2

Варианты VH

Аминокислотное положение	IPN002 (исходное антитело)	Вариант VH 1	Вариант VH 2	Вариант VH 3	Вариант VH 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
85	L	S	L	L	L
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, заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую замену H→Q в аминокислотном положении 3 в FR1 VH и/или замену K→R в аминокислотном положении 19 в FR1 VH.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую замену T→A в аминокислотном положении 40 в FR2 VH и/или замену D→G в аминокислотном положении 42 в FR2 VH и/или замену R→G в положении 44 в FR2 VH.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тя-

желой цепи, содержащую замену Q→R в аминокислотном положении 66 в FR3 VH и/или замену S→N в аминокислотном положении 83 в FR3 VH и/или замену L→S в аминокислотном положении 85 в FR3 VH и/или замену K→R в аминокислотном положении 86 в FR3 и/или замену S→A в аминокислотном положении 87 в FR3 VH и/или замену S→A в аминокислотном положении 93 в FR3 VH.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую замену S→T в аминокислотном положении 108 в VH FR4.

В некоторых случаях заявленное выделенное антитело к Тау может содержать в направлении от N-конца к С-концу область VH, содержащую

EVX₁LVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFSFS (SEQ ID NO:83); CDR1 VH, как показано на фиг. 2А;

WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:84); CDR2 VH, как показано на фиг. 2А;

RFTISRDNAKNTLYLQMX₂SX₃X₄EDTAMYYCX₆I (SEQ ID NO:85); CDR3 VH, как показано на фиг. 2А;

WGQGTGX₇VTVSS (SEQ ID NO:86),

где X₁ представляет собой H или Q; X₂ представляет собой S или N; X₃ представляет собой S или L; X₄ представляет собой K или R; X₅ представляет собой S или A; X₆ представляет собой S или A и X₇ представляет собой S или T.

Заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 каркасных (FR) аминокислотных замен относительно аминокислотных последовательностей FR исходного антитела IPN002, представленных в табл. 3.

Таблица 3

Варианты Vk

Аминокислотное положение	IPN002 (исходное антитело)	Вариант Vk 1	Вариант Vk 2	Вариант Vk 3	Вариант Vk 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, заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую замену L→V в аминокислотном положении 3 в FR1 VL, и/или замену T→S в аминокислотном положении 7 в FR1 VL, и/или замену S→T в аминокислотном положении 14 в FR1 VL, и/или замену D→Q в аминокислотном положении 17 в FR1 VL, и/или замену Q→P в аминокислотном положении 18 в FR1 VL.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую замену K→Q в аминокислотном положении 45 FR2 VL и/или замену V→I в аминокислотном положении 48 FR2 VL.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую замену L→V в аминокислотном положении 83 FR3 VL и/или замену T→V в аминокислотном положении 85 FR3 VL.

В качестве другого примера заявленное антитело к Тау может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую замену L→V в аминокислотном положении 104 FR4 VL.

В некоторых случаях заявленное выделенное антитело к Тау может содержать, в направлении от N-конца к С-концу область VL, содержащую:

DVX₁MTQSPLSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO:54); CDR1 VL, как показано на фиг. 2В;

WYLQKPGQSPQLLX₂Y (SEQ ID NO:55); CDR2 VL, как показано на фиг. 2В;

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVX₃YYC (SEQ ID NO:56); CDR3 VL, как показано на фиг. 2В;

FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:57);

где X₁ представляет собой L или V; X₂ представляет собой V или I и X₃ представляет собой T или V.

В некоторых случаях антитело к Тау согласно настоящему изобретению содержит:

а) вариант VH 1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 9; и вариант Vk 1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 13;

б) вариант VH 1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 9; и вариант Vk 2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 14;

с) вариант VH 1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 9; и вариант Vk 3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 15;

д) вариант VH 1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 9; и

конца к С-концу: область FR1 тяжелой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; область FR2 тяжелой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; область FR3 тяжелой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; необязательно область FR4 тяжелой цепи; линкер; необязательно область FR1 легкой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; область FR2 легкой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; область FR3 легкой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и область FR4 легкой цепи. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления одна или несколько из областей FR представляют собой гуманизированную область FR. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления каждая из областей FR представляет собой гуманизированную область FR. Линкерная область может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот в длину, например от приблизительно 5 до приблизительно 10 аа, от приблизительно 10 до приблизительно 15 аа, от приблизительно 15 до приблизительно 20 аа, от приблизительно 20 до приблизительно 25 аа, от приблизительно 25 до приблизительно 30 аа, от приблизительно 30 до приблизительно 35 аа, от приблизительно 35 до приблизительно 40 аа, от приблизительно 40 до приблизительно 45 аа или от приблизительно 45 до приблизительно 50 аа в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит в направлении от N-конца к С-концу: область FR1 легкой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; область FR2 легкой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; область FR3 легкой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; необязательно область FR4 легкой цепи; линкерную область; необязательно область FR1 тяжелой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; область FR2 тяжелой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; область FR3 тяжелой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и область FR4 тяжелой цепи. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления одна или несколько из областей FR представляют собой гуманизированную область FR. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления каждая из областей FR представляет собой гуманизированную область FR. Линкерная область может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот в длину, например от приблизительно 5 до приблизительно 10 аа, от приблизительно 10 до приблизительно 15 аа, от приблизительно 15 до приблизительно 20 аа, от приблизительно 20 до приблизительно 25 аа, от приблизительно 25 до приблизительно 30 аа, от приблизительно 30 до приблизительно 35 аа, от приблизительно 35 до приблизительно 40 аа, от приблизительно 40 до приблизительно 45 аа или от приблизительно 45 до приблизительно 50 аа в длину.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит в направлении от N-конца к С-концу: область FR1 тяжелой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; область FR2 тяжелой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; область FR3 тяжелой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; необязательно область FR4 тяжелой цепи; линкер; необязательно область FR1 легкой цепи; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; область FR2 легкой цепи; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; область FR3 легкой цепи; CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и область FR4 легкой цепи. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления одна или несколько из областей FR представляет собой гуманизированную область FR. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления каждая из областей FR представляет собой гуманизированную область FR. Линкерная область может составлять от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 50 аминокислот в длину, например от приблизительно 5 до приблизительно 10 аа, от приблизительно 10 до приблизительно 15 аа, от приблизительно 15 до приблизительно 20 аа, от приблизительно 20 до приблизительно 25 аа, от приблизительно 25 до приблизительно 30 аа, от приблизительно 30 до приблизительно 35 аа, от приблизительно 35 до приблизительно 40 аа, от приблизительно 40 до приблизительно 45 аа или от приблизительно 45 до приблизительно 50 аа в длину.

Подходящие для применения в заявленном антителе линкеры включают в себя "гибкие линкеры". Если они присутствуют, линкерные молекулы, как правило, характеризуются достаточной длиной для обеспечения возможности некоторого гибкого движения между связанными областями. Линкерные молекулы, как правило, приблизительно 6-50 атомов в длину. Линкерные молекулы могут также, например, представлять собой олигомеры арилацетилена, этиленгликоля, содержащие 2-10 мономерных единиц, диамины, дисколоты, аминокислоты или их комбинации. Другие линкерные молекулы, которые могут связываться с полипептидами, могут быть использованы в свете настоящего изобретения.

Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут характеризоваться любой подходящей различной длиной, такой как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 до 15 аминокислот.

кислот, от 3 до 12 аминокислот, включая в себя 4-10 аминокислот, 5-9 аминокислот, 6-8 аминокислот или 7-8 аминокислот и может составлять 1-6 или 7 аминокислот.

Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя глициновые полимеры $(G)_n$, глицин-сериновые полимеры (включая в себя, например, $(GS)_n$, $GSGGS_n$ (SEQ ID NO: 58) и $GGGS_n$ (SEQ ID NO: 59), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в настоящей области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры представляют интерес, поскольку обе из этих аминокислот являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтрального связующего между компонентами. Глициновые полимеры представляют особый интерес, поскольку глицин достигает существенно больше фи-пси пространства, даже чем аланин, и намного меньше ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (смотрите Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя без ограничения

$GGSG$ (SEQ ID NO:60), $GSGG$ (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 подобное. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что структура пептида, конъюгированного с любыми описанными выше элементами, может включать в себя линкеры, которые являются полностью или частично гибкими так, что линкер может включать в себя гибкий линкер, а также одну или несколько частей, которые обеспечивают менее гибкую структуру.

В некоторых случаях заявленное выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, F_v , scF_v , Fab , $F(ab')_2$ или Fab' . Таким образом, настоящее изобретение включает выделенное антитело, причем антитело представляет собой F_v , scF_v , Fab , $F(ab')_2$ или Fab' и конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида τ с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12.

Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных каркасных области VL, описанных выше. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизированных каркасных области VH, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к τ согласно настоящему изобретению представляет собой антитело scF_v . Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к τ согласно настоящему изобретению содержит мультимеры scF_v . Например, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело представляет собой димер scF_v (например, содержит два tandemных scF_v (scF_v_2)), тример scF_v (например, содержит три tandemных scF_v (scF_v_3)), тетрамер scF_v (например, содержит четыре tandemных scF_v (scF_v_4)), или представляет собой мультимер из больше чем четырех scF_v (например, в tandemе). Мономеры scF_v могут быть соединены в tandem посредством линкеров, составляющих от приблизительно 2 до приблизительно 10 аминокислот (aa) в длину, например 2-9 или 10 aa в длину. Подходящие линкеры включают в себя, например, $(Gly)_x$, где x представляет собой целое число от 2 до 10. Другие подходящие линкеры представляют собой обсуждаемые выше линкеры. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из мономеров scF_v в заявленном мультимере scF_v является гуманизированным, как описано выше.

В некоторых случаях заявленное антитело содержит константную область иммуноглобулина (например, область F_c). Область F_c , если она присутствует, может представлять собой область F_c человека. Если константные области присутствуют, антитело может содержать константные области как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Подходящая константная область тяжелая цепь включает в себя области CH1, шарнир, CH2, CH3 и CH4. Описанные в настоящем документе антитела включают в себя антитела, характеризующиеся всеми типами константных областей, включая в себя IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любой изотип, включая в себя IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Пример подходящей области F_c тяжелой цепи представляет собой F_c изотипа IgG1 человека. В некоторых случаях область тяжелой цепи относится к изотипу IgG4. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления шарнирная область содержит замену S241P; смотрите, например, Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105. Константная область легкой цепи может представлять собой лямбда или каппа. Заявленное антитело (например, заявленное гуманизированное антитело) может содержать последовательности больше чем из одного класса или изотипа. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легких и две тяжелых цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab , Fab' , $F(ab')_2$ и F_v или в виде одноцепочечных антител, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепи связаны посредством спейсера.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает выделенное анти-

тело, причем выделенное антитело содержит константную область легкой цепи человека и константную область тяжелой цепи человека, и причем выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида Тау с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре описанных выше гуманизированных каркасных области VL. Согласно некоторым из указанных вариантов осуществления выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре описанных выше гуманизированных каркасных области VH.

Заявленное антитело может содержать свободную тиольную (-SH) группу на карбоксильном конце, где свободная тиольная группа может использоваться для прикрепления антитела ко второму полипептиду (например, другому антителу, включая в себя заявленное антитело), каркасу, носителю и т.д.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит одну или несколько не встречающихся в природе аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления не кодируемая естественным образом аминокислота содержит группу карбонила, группу ацетила, группу аминоокси, группу гидразина, группу гидразида, группу семикарбазида, группу азида или группу алкина; смотрите, например, патент США № 7632924 для подходящих не встречающихся в природе аминокислот. Введение не встречающейся в природе аминокислоты может обеспечить связь с полимером, вторым полипептидом, каркасом и т.д. Например, заявленное антитело, связанное с водорастворимым полимером, может быть получено путем реакции водорастворимого полимера (например, ПЭГ), который содержит карбонильную группу, с антителом, где антитело содержит не кодируемую в природе аминокислоту, которая содержит группу аминоокси, гидразина, гидразида или семикарбазида. В качестве другого примера заявленное антитело, связанное с водорастворимым полимером, может быть получено путем реакции заявленного антитела, которое содержит алкин-содержащую аминокислоту, с водорастворимым полимером (например, ПЭГ), который содержит фрагмент азида; согласно некоторым вариантам осуществления группа азида или алкина связана с молекулой ПЭГ посредством амидной связи. "Не кодируемая в природе аминокислота" относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 часто встречающихся аминокислот или пирролизина или селеноцистеина. Другие термины, которые можно использовать синонимично с термином "не кодируемая в природе аминокислота" представляют собой "неприродная аминокислота", "искусственная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и их различные написанные через дефис и не написанные через дефис варианты. Термин "не кодируемая в природе аминокислота" также включает в себя без ограничения аминокислоты, которые возникают путем модификации (например, посттрансляционных модификаций) кодируемой в природе аминокислоты (включая в себя без ограничения 20 часто встречающихся аминокислот или пирролизин и селеноцистеин), но которые сами по себе не встраиваются естественным образом в растущую полипептидную цепь с помощью трансляционного комплекса. Примеры таких не встречающихся в природе аминокислот включают в себя без ограничения N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело связано (например, ковалентно связано) с полимером (например, полимером, отличным от полипептида). Подходящие полимеры включают в себя, например, биосовместимые полимеры и водорастворимые биосовместимые полимеры. Подходящие полимеры включают в себя синтетические полимеры и встречающиеся в природе полимеры. Подходящие полимеры включают в себя, например, замещенные или незамещенные полиалкиленовые, полиалкениленовые или полиоксиалкиленовые полимеры с неразветвленной или разветвленной цепью или разветвленные или неразветвленные полисахариды, например, гомо- или гетерополисахарид. Подходящие полимеры включают в себя, например, сополимер этилена и винилового спирта (широко известный под своим непатентованным названием EVOH или под торговым названием EVAL); полибутилметакрилат; поли(гидроксивалерат); поли(L-молочная кислота); поликапролактон; сополимер лактила и гликолида; поли(гидроксibuтират); сополимер гидроксibuтирата и валерата; полидиоксанон; сложный полиортоэфир; полиангидрид; поли(гликолевая кислота); поли(D,L-молочная кислота); сополимер гликолевой кислоты и триметиленкарбоната; сложный полифосфэфир; сложный полифосфэфируретан; поли(аминокислоты); цианоакрилаты; поли(триметиленкарбонат); поли(иминокарбонат); сополимер простых и сложных эфиров (например, сополимеры полиэтиленоксида и полимолочной кислоты (PEO/PLA)); полиалкиленоксалаты; полифосфазены; биомолекулы, такие как фибрин, фибриноген, целлюлоза, крахмал, коллаген и гиалуроновая кислота; полиуретаны; силиконы; сложные полиэфиры; полиолефины; полиизобутилен и сополимеры этилена и альфа-олефина; акриловые полимеры и сополимеры; полимеры и сополимеры винилгалогениды, такие как поливинилхлорид; поливиниловые эфиры, такие как поливинилметилэфир; поливинилиденгалогениды, такие как поливинилиденфторид и по-

ливинилиденсхлорид; полиакрилонитрил; поливинилкетоны; поливиниловые ароматические соединения, такие как полистирол; поливиниловые сложные эфиры, такие как поливинилацетат; сополимеры виниловых мономеров друг с другом и олефинами, такие как сополимеры этилена и метилметакрилата, сополимеры акрилонитрила и стирола, смолы ABS и сополимеры этилена и винилацетата; полиамиды, такие как нейлон 66 и поликапролактан; алкидные смолы; поликарбонаты; полиоксиметилены; полиимиды; простые полиэфиры; эпоскидные смолы; полиуретаны; искусственный шелк; триацетатный шелк; целлюлоза; ацетат целлюлозы; бутират целлюлозы; ацетатбутират целлюлозы; целлофан; нитрат целлюлозы; пропионат целлюлозы; простые эфиры целлюлозы; аморфный тефлон; поли(этиленгликоль) и карбоксиметилцеллюлоза.

Подходящие синтетические полимеры включают в себя незамещенный и замещенный неразветвленный или разветвленный поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль) поли(виниловый спирт) и их производные, например, замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) и их производные. Подходящие встречающиеся в природе полимеры включают в себя, например, альбумин, амилозу, декстран, гликоген и их производные.

Подходящие полимеры могут характеризоваться средней молекулярной массой в диапазоне от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да или от 25000 до 40000 Да. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, где заявленное антитело содержит полимер поли(этиленгликоль) (ПЭГ) или метоксиполи(этиленгликоль), полимер ПЭГ или метоксиполи(этиленгликоль) может характеризоваться средней молекулярной массой диапазоне от приблизительно 0,5 до 1 кДа, от приблизительно 1 до 5 кДа, от 5 до 10 кДа, от 10 до 25 кДа, от 25 до 40 кДа или от 40 до 60 кДа.

Как отмечено выше, согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело ковалентно связано с полимером ПЭГ. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленный мультимер scFv ковалентно связан с полимером ПЭГ; смотрите, например, Albrecht et al. (2006) J. Immunol. Methods 310:100. Способы и реагенты, подходящие для пегилирования белка, хорошо известны в настоящей области техники и их можно найти, например, в патенте США № 5849860. ПЭГ, подходящий для конъюгации с белком, как правило, является растворимым в воде при комнатной температуре и характеризуется общей формулой $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R представляет собой водород или защитную группу, такую как группа алкила или алканола, и где n представляет собой целое число от 1 до 1000. Если R представляет собой защитную группу, она, как правило, содержит от 1 до 8 атомов углерода.

ПЭГ, конъюгированный с заявленным антителом, может являться линейным. ПЭГ, конъюгированный с заявленным белком, также может являться разветвленным. Разветвленные производные ПЭГ, такие как производные, описанные в патенте США № 5643575, "Звездчатые ПЭГ" и ПЭГ с многочисленными ветвями, такие как описаны в Shearwater Polymers, Inc. catalog "Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998." Звездчатые ПЭГ описаны в настоящей области техники включая в себя, например, патент США № 6046305.

Заявленное антитело может являться гликозилированным, например заявленное антитело может содержать ковалентно связанный углеводный или полисахаридный фрагмент. Гликозилирование антител является либо N-связанным, либо O-связанным. N-Связанный относится к прикреплению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного прикрепления углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из указанных трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-Связанное гликозилирование относится к прикреплению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамину, чаще всего к серину или треонину, через 5-гидроксипролин или также может быть использован 5-гидроксиллизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу легко осуществить путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или несколько из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществить путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина на последовательность исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования). Аналогично, удаление сайтов гликозилирования можно осуществить путем изменения аминокислот в пределах нативных сайтов гликозилирования антитела.

Заявленное антитело согласно некоторым вариантам осуществления будет содержать "рентгеноконтрастную" метку, например метку, которую можно легко визуализировать с применением, например, рентгеновских лучей. Рентгеноконтрастные материалы хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Наиболее распространенные рентгеноконтрастные материалы включают в себя соли йода, брома или бария. Другие рентгеноконтрастные материалы также известны и включают в себя без ограничения органические производные висмута (смотрите, например, патент США № 5939045), рентгеноконтрастные мультимеры (смотрите патент США № 5346981), органовисмутовые композитные материалы (смотрите, например, патент США № 5256334), рентгеноконтрастные мультимерные комплексы бария (смотрите, например, патент США № 4866132) и подобное.

Заявленное антитело может быть ковалентно связано со вторым фрагментом (например, липидом, полипептидом, отличным от заявленного антитела, синтетическим полимером, углеводом и подобным) с применением, например, глутаральдегида, гомобифункционального перекрестно сшивающего линкера или гетеробифункционального перекрестно сшивающего линкера. Глутаральдегид перекрестно сшивает полипептиды посредством их аминокислотных фрагментов. Гомобифункциональные перекрестно сшивающие линкеры (например, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, гомобифункциональные N-гидроксисукцинимидовые (NHS) сложные эфиры или гомобифункциональные сульфгидрильный реактивный перекрестно сшивающий линкер) содержат два или более идентичных реактивных фрагментов и могут использоваться в процедуре одностадийной реакции, в которой перекрестно сшивающий линкер добавляют к раствору, содержащему смесь подлежащих связыванию полипептидов. Гомобифункциональный NHS сложный эфир и сложные имидоэфиры перекрестно сшивают аминокислотные полипептиды. При слабом щелочном pH сложные имидоэфиры реагируют только с первичными аминами с образованием имидоамидов, и общий заряд перекрестно сшитых полипептидов не изменяется. Гомобифункциональные сульфгидрильные реактивные перекрестно сшивающие линкеры включают в себя бисмалеимидгексан (BMH), 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (DFDNB) и 1,4-ди-(3',2'-пиридилдитио)пропионамидобутан (DPDPB).

Гетеробифункциональные перекрестно сшивающие линкеры содержат два или больше различных реактивных фрагментов (например, аминный реактивный фрагмент и сульфгидрильный реактивный фрагмент) и перекрестно сшиваются с одним из полипептидов посредством аминного или сульфгидрильного реактивного фрагмента, затем реагируют с другим полипептидом посредством непрореагировавшего фрагмента. Доступны многочисленные гетеробифункциональные галоацетильные перекрестно сшивающие линкеры, а также пиридилдисульфидные перекрестно сшивающие линкеры. Карбодиимиды представляют собой классический пример гетеробифункциональных перекрестно сшивающих реагентов для связывания карбоксилатов с аминами, что дает в результате амидную связь.

Заявленное антитело может быть иммобилизовано на твердой подложке. Подходящие подложки хорошо известны в настоящей области техники и содержат среди прочего коммерчески доступные материалы колонок, полистирольные гранулы, латексные гранулы, магнитные гранулы, частицы коллоидных металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембраны, листы, дурациты, лунки реакционных пластинок (например, многоруночные планшеты), пластиковые пробирки и т.д. Твердая подложка может содержать любое из многочисленных веществ, включая в себя, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, естественные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Подходящие способы для иммобилизации заявленного антитела на твердой подложке хорошо известны и включают в себя без ограничения ионные, гидрофобные, ковалентные взаимодействия и подобное. Твердые подложки могут являться растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящая твердая подложка, является, как правило, нерастворимой в водном растворе.

Заявленное антитело согласно некоторым вариантам осуществления будет содержать обнаруживаемую метку. Подходящие обнаруживаемые метки включают в себя любую композицию, обнаруживаемую с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, электрических, оптических или химических средств. Подходящие метки включают в себя без ограничения магнитные микроносители (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, флуоресцеин изотиоцианат, техасский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и подобное), радиоактивные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, люцифераза и другие метки, широко используемые в иммуноферментном анализе (ELISA)) и такие колориметрические метки, как гранулы из коллоидного золота или окрашенные стеклянные или пластиковые (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т.д.) гранулы.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит контрастное средство или радиоактивный изотоп, причем контрастное средство или радиоактивный изотоп представляет собой средство, которое является подходящим для применения в визуализации, например процедурах визуализации, проводимых на людях. Не ограничивающие примеры меток включают в себя такой радиоактивный изотоп, как ^{123}I (йод), ^{18}F (фтор), ^{99}Tc (технеций), ^{111}In (индий) и ^{67}Ga (галлий), и такое контрастное средство, как гадолиний (Gd), диспрозий и железо. Радиоактивные изотопы Gd (^{153}Gd) также являются доступными и подходящими для процедур визуализации у не являющихся человеком млекопитающих. Заявленное антитело может быть помечено с применением стандартных техник. Например, заявленное антитело может быть йодировано с применением хлорамина Т или 1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилгликоурида. Для фторирования фтор добавляют к заявленному антителу во время синтеза с помощью реакции вытеснения фторид-иона; смотрите, Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) и Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst, 16(2): 209-244 (1999) для обзора синтеза белков с такими радиоактивными изотопами. Заявленное антитело может также быть помечено с помощью контрастного сред-

ства посредством стандартных техник. Например, заявленное антитело может быть помечено с помощью Gd путем конъюгации низкомолекулярных хелатов Gd, таких как Gd и диэтилтриаминапентауксусной кислоты (GdDTPA) или Gd и тетраазациклодекантетрауксусной кислоты (GdDOTA) к антителам; смотрите, Caravan et al., Chem. Rev. 99:2293-2352 (1999) и Lauffer et al., J. Magn. Reson. Imaging, 3:11-16 (1985). Заявленное антитело может быть помечено с помощью Gd путем, например, конъюгации хелатов полилизин-Gd с антителом; смотрите, например, Curtet et al., Invest. Radiol., 33(10):752-761 (1998). Альтернативно, заявленное антитело может быть помечено с помощью Gd путем инкубации парамагнитных полимеризованных липосом, которые включают в себя Gd хелаторный липид, с авидином и биотинилированным антителом; смотрите, например, Sipkins et al., Nature Med., 4:623-626 (1998).

Подходящие флуоресцентные белки, которые могут быть связаны с заявленным антителом, включают в себя без ограничения зеленый флуоресцентный белок из *Aequoria victoria* или его мутант или производное, например, описанные в патентах США №№ 6066476; 6020192; 5985577; 5976796; 5968750; 5968738; 5958713; 5919445; 5874304; например, усиленный GFP, многие такие GFP, которые являются коммерчески доступными, например, от Clontech, Inc.; красный флуоресцентный белок; желтый флуоресцентный белок; любой из разнообразных флуоресцентных и окрашенных белков из Anthozoan species, описанные, например, в Matz et al. (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973; и подобное.

Заявленное антитело согласно некоторым вариантам осуществления будет связано с (например, ковалентно или нековалентно связано) партнером по слиянию, например, лигандом; эпитопной меткой; пептидом; белком, отличным от антитела; и подобным. Подходящие партнеры по слиянию включают в себя пептиды и полипептиды, которые придают усиленную стабильность *in vivo* (например, увеличенный период полужизни в сыворотке); обеспечивают простоту очищения, например, (His)_n, например 6His и подобное; обеспечивают секрецию слитого белка из клетки; обеспечивают эпитопную метку, например GST, гемагглютинин (HA; например, YPYDVPDYA; SEQ ID NO:71), FLAG (например, DYKDDDDK; SEQ ID NO:69), с-мус (например, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:68) и подобное; обеспечивают обнаруживаемый сигнал, например фермент, который образует обнаруживаемый продукт (например, β-галактозидаза, люцифераза) или белок, который сам по себе является обнаруживаемым, например зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и т.д.; обеспечивает мультимеризацию, например мультимеризацию такого домена, как часть Fc иммуноглобулина; и подобное.

Слияние также может включать в себя аффинный домен, включая в себя пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать с партнером по связыванию, например, таким как партнер, иммобилизованный на твердой подложке, применимой для идентификации или очищения. Последовательные отдельные аминокислоты, такие как гистидин, при слиянии с белком могут использоваться для одностадийного очищения слитого белка с помощью высокоаффинного связывания с колонкой со смолой, такой как никель-сефароза. Иллюстративные аффинные домены включают в себя

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, связывающий целлюлозу домен, RYIRS (SEQ ID NO:72), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO: 73), связывающий хитин домен, S-пептид, пептид T7, домен SH2, метку C-конца РНК, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:74), связывающие металлы домены, например связывающие цинк домены или связывающие кальций домены, такие как домены из кальцийсвязывающих белков, например кальмодулина, тропонина С, кальциневрина В, легкой цепи миозина, рековерина, S-модулина, визинина, VTLIP, нейрокальцина, гиппокальцина, фреквенина, кальтрацина, большой субъединицы кальпаина, белков S100, парвальбумина, кальбиндина D9K, кальбиндина D28K и кальретинина, интеинов, биотина, стрептавидина, MyoD, последовательностей лейционовой молнии и связывающего мальтозу белка.

Заявленное антитело согласно некоторым вариантам осуществления будет слито с полипептидом, который связывается с эндогенным рецептором гематоэнцефалического барьера (BBB). Связывание заявленного антитела с полипептидом, который связывается с эндогенным рецептором BBB, облегчает пересечение BBB, например, в заявленном способе лечения (смотрите ниже), включающем введение заявленного антитела нуждающемуся в этом индивидууму. Подходящие полипептиды, которые связываются с эндогенным рецептором BBB, включают в себя антитела, например моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эндогенным рецептором BBB. Подходящие эндогенные рецепторы BBB включают в себя без ограничения рецептор инсулина, рецептор трансферрина, рецептор лептина, рецептор липопротеина и рецептор инсулиноподобного фактора роста; смотрите, например, патентную публикацию США № 2009/0156498.

В качестве примера заявленное антитело к Тау может представлять собой биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау (например, линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау или в пределах аминокислот 9-18 Тау); и вторую антигенсвязывающую часть, которая связывает эндогенный рецептор BBB. Например, в некоторых случаях заявленное антитело к Тау представляет собой биспецифическое антитело, содержащее

первую антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает эпитоп в полипептиде Тау (например, линейный эпитоп в пределах аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау или в пределах аминокислот 9-18 Тау); и вторую антигенсвязывающую часть, которая связывает рецептор трансферрина.

Например, антитело к Тау согласно настоящему изобретению может быть слито с пептидом, который облегчает пересечение BBB, причем пептид характеризуется длиной, составляющей от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот, и содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности в отношении одного из следующих пептидов:

Angiopep-1 (TFFYGGCRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:75); Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:76); cys-Angiopep-2 (CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO:77); Angiopep-2-cys (TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC; SEQ ID NO:78);

и фрагмент апротинина (TFVYGGCRAKRNNFKS; SEQ ID NO:79); смотрите, например, патентные публикации США № 2011/0288011 и 2009/0016959. Пептид, который облегчает пересечение BBB, может быть слит с N-концом области легкой цепи антитела к Тау, с C-концом области легкой цепи антитела к Тау, с N-концом области тяжелой цепи антитела к Тау, с C-концом области тяжелой цепи антитела к Тау, с N-концом заявленного одноцепочечного антитела к Тау, с C-концом заявленного одноцепочечного антитела к Тау и т.д.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело содержит полиаминную модификацию. Полиаминная модификация заявленного антитела усиливает проницаемость модифицированного антитела на BBB. Заявленное антитело может быть модифицировано с помощью полиаминов, которые являются либо встречающимися в природе, либо синтетическими; смотрите, например, патент США № 5670477. Применимые встречающиеся в природе полиамины включают в себя путресцин, спермидин, спермин, 1,3-диаминопропан, норспермидин, син-гомоспермидин, термин, термоспермин, кальдопентамин, гомо кальдопентамин и канавалмин. Путресцин, спермидин и спермин являются особенно применимыми. Синтетические полиамины, характеризующиеся эмпирической формулой $C_xH_yN_z$, могут представлять собой циклические или ациклические, разветвленные или неразветвленные углеводородные цепи из 3-12 атомов углерода, которые дополнительно включают в себя фрагменты 1-6 NR или $N(R)_2$, причем R представляет собой H, (C_1-C_4) алкил, фенил или бензил. Полиамины могут быть связаны с антителом с применением любого стандартного способа образования перекрестных сшивок.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело является модифицированным, чтобы включать в себя углеводный фрагмент, где углеводный фрагмент может быть ковалентно связанным с антителом. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело является модифицированным, чтобы включать в себя липидный фрагмент, где липидный фрагмент может быть ковалентно связанным с антителом. Подходящие липидные фрагменты включают в себя, например, такую N-жирную ацильную группу, как N-лауроил, N-олеоил и т.д.; такой жирный амин, как додециламин, олеоиламин и т.д.; C_3-C_{16} длинноцепочечный алифатический липид; и подобное; смотрите, например, патент США № 6638513). Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело заключено в липосому.

Способы получения заявленного антитела

Заявленное антитело может быть получено путем любого известного способа, например общепринятых синтетических способов для белкового синтеза; способов рекомбинантной ДНК и т.д.

Если заявленное антитело представляет собой одноцепочечный полипептид, он может быть синтезирован с применением стандартных техник химического пептидного синтеза. Если полипептид синтезирован химически, синтез может происходить посредством жидкой фазы или твердой фазы. Твердофазный полипептидный синтез (SPPS), в котором C-концевая аминокислота последовательности прикрепляется к нерастворимой подложке с последующим последовательным добавлением оставшихся аминокислот в последовательности, представляет собой пример подходящего способа для химического синтеза заявленного антитела. Различные формы SPPS, такие как Fmoc и Boc, доступны для синтеза заявленного антитела. Техники для твердофазного синтеза описаны Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 в 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 J.A. et al., 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8. Кратко, небольшие нерастворимые пористые гранулы обрабатывают функциональными структурными единицами, на которых строятся пептидные цепи. После повторного цикла сочетания/удаления защитных групп свободный N-концевой амин твердофазного прикрепления соединяют с отдельной N-защищенной аминокислотной структурной единицей. Указанная структурная единица затем подвергается удалению защитных групп, высвобождая новый N-концевой амин, к которому может прикрепляться дополнительная аминокислота. Пептид остается иммобилизованным на твердой фазе и подвергается процессу фильтрации до отщепления.

Стандартные рекомбинантные способы могут быть использованы для получения заявленного анти-

тела. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепи, не обязательно связанные с константными областями, вводят в экспрессионные векторы. Легкие и тяжелые цепи могут быть клонированы в один и тот же или различные экспрессионные векторы. Сегменты ДНК, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, функционально соединены с контролирующими последовательностями в экспрессионном(ых) векторе(ах), что обеспечивает экспрессию иммуноглобулиновых полипептидов. Контролирующие экспрессию последовательности включают в себя без ограничения промоторы (например, ассоциированные в природе или гетерологичные промоторы), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминирования транскрипции. Контролирующие экспрессию последовательности могут представлять собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев (например, клеток COS или CHO). Как только вектор был встроен в соответствующего хозяина, хозяина содержат в условиях, подходящих для экспрессии высокого содержания нуклеотидных последовательностей и сбора и очищения антител.

Вследствие вырожденности генетического кода разнообразные последовательности нуклеиновых кислот могут кодировать каждую аминокислотную последовательность иммуноглобулина. Требуемые последовательности нуклеиновых кислот можно получить с помощью *de novo* твердофазного синтеза ДНК или путем мутагенеза с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) предварительно полученного варианта требуемого полинуклеотида. Посредством олигонуклеотидами мутагенез представляет собой пример подходящего способа для получения вариантов ДНК целевого полипептида с заменой, делецией и вставкой; смотрите Adelman et al., DNA 2:183 (1983). Кратко, ДНК целевого полипептида изменяют путем гибридизации олигонуклеотида, кодирующего требуемую мутацию в одноцепочечной матрице ДНК. После гибридизации используют ДНК-полимеразу для синтеза целой второй комплементарной цепи матрицы, которая встраивает олигонуклеотидный праймер и кодирует выбранное изменение в ДНК целевой полипептидной.

Подходящие экспрессионные векторы, как правило, являются реплицируемыми в организмах хозяев или в виде эписом, или как составная часть хромосомной ДНК хозяина. Как правило, экспрессионные векторы содержат селективные маркеры (например, устойчивости к ампициллину, устойчивости к гентамицину, устойчивости к тетрациклину, устойчивости к канамицину или устойчивости к неомицину) для обеспечения обнаружения указанных клеток, трансформированных требуемыми последовательностями ДНК.

Escherichia coli представляет собой пример прокариотической клетки-хозяина, которая может использоваться для клонирования кодирующего заявленное антитело полинуклеотида. Другие подходящие для применения микробиологические хозяева включают в себя такие бактерии, как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В указанных прокариотических хозяевах также можно получить экспрессионные векторы, которые будут, как правило, содержать контролирующую экспрессию последовательности, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое число разнообразных хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система из фага лямбда. Промоторы будут, как правило, контролировать экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности, и содержать последовательности сайта связывания рибосомы и подобное, для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также применимы для экспрессии. *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* представляют собой примеры подходящих дрожжевых клеток-хозяев, с подходящими векторами, характеризующимися контролирующими экспрессию последовательностями (например, промоторами), точкой начала репликации, терминирующими последовательностями и подобным при необходимости. Типичные промоторы включают в себя 3-фосфоглицераткиназа и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают в себя среди прочего промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы.

В дополнение к микроорганизмам клетки млекопитающих (например, клетки млекопитающих, выращенные в клеточной культуре *in vitro*) также можно использовать для экспрессии и получения антитела к Тау согласно настоящему изобретению (например, полинуклеотиды, кодирующие заявленное антитело к Тау); смотрите Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Подходящие относящиеся к млекопитающим клетки-хозяева включают в себя клеточные линии CHO, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, клеточные линии миеломы и трансформированные В-клетки или гибридомы. Экспрессионные векторы для указанных клеток могут включать в себя такие контролирующие экспрессию последовательности, как точка начала репликации, промотор и энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и терминирующие транскрипцию последовательности. Примеры подходящих контролирующей экспрессию последовательностей представляют собой промоторы, происходящие из генов иммуноглобулина, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного ро-

готового скота, цтотомегаловируса и подобного; смотрите Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Будучи синтезированными (либо химически, либо рекомбинантно), целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы заявленного антитела (например, scFv и т.д.) могут быть очищены согласно стандартным процедурам, известным в настоящей области техники, включая в себя осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, очищение с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), гель-электрофорез и подобное (смотрите в общем Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Заявленное антитело может являться по существу чистым, например, по меньшей мере приблизительно на 80-85% чистым, по меньшей мере приблизительно на 85-90% чистым, по меньшей мере приблизительно на 90-95% чистым или на 98-99% или более чистым, например, свободным от таких примесей, как клеточный детрит, макромолекулы, отличные от заявленного антитела, и т.д.

Композиции.

Настоящее изобретение включает композицию, содержащую заявленное антитело. Композиция заявленного антитела может содержать, в дополнение к заявленному антителу, одно или несколько из следующего: соль, например NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.; буферное средство, например трис-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), натриевая соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS), N-трис-[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновая кислота (TAPS) и т.д.; солилизатор; детергент, например неионный детергент, такой как Tween-20 и т.д.; ингибитор протеазы; глицерин и подобное.

Нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы и клетки-хозяева.

Настоящее изобретение включает нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие заявленное антитело к Тау.

Кодирующая заявленное антитело к Тау нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и характеризующуюся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью нуклеотидной последовательности в отношении нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 1B и представленной в SEQ ID NO: 17.

Кодирующая заявленное антитело к Тау нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и характеризующуюся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью нуклеотидной последовательности в отношении нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 1A и представленной в SEQ ID NO: 18.

Кодирующая заявленное антитело к Тау нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и характеризующуюся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью нуклеотидной последовательности в отношении нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 2B и представленной в SEQ ID NO: 19.

Кодирующая заявленное антитело к Тау нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и характеризующуюся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью нуклеотидной последовательности в отношении нуклеотидной последовательности, представленной на фиг. 2A и представленной в SEQ ID NO: 20.

Кодирующая заявленное антитело нуклеотидная последовательность может быть функционально соединена с одним или несколькими регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые обеспечивают возможность экспрессии нуклеотидной последовательности в предусмотренных целевых клетках (например, клетке, которая является генетически модифицированной для синтеза кодируемого антитела).

Подходящие промоторные и энхансерные элементы известны в настоящей области техники. Для экспрессии в бактериальной клетке подходящие промоторы включают в себя без ограничения lacI, lacZ, T3, T7, gpt, лямбда Р и trc. Для экспрессии в эукариотической клетке подходящие промоторы включают в себя без ограничения промоторные и энхансерные элементы гена легкой и/или тяжелой цепи иммуноглобулина; немедленно-ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных концевых повторах из ретровируса; промотор металлопротеиназы-I мыши и различные известные в настоящей области техники тканеспецифические промоторы.

Согласно некоторым вариантам осуществления, например, для экспрессии в дрожжевой клетке подходящий промотор представляет собой такой конститутивный промотор, как промотор ADHI, промотор PGK1, промотор ENO, промотор PYK1 и подобное; или такой регулируемый промотор, как промотор GAL1, промотор GAL10, промотор ADH2, промотор PHO5, промотор CUP1, промотор GAL7, промотор MET25, промотор MET3, промотор CYC1, промотор HIS3, промотор ADHI, промотор PGK, промотор GAPDH, промотор ADC1, промотор TRP1, промотор URA3, промотор LEU2, промотор ENO,

промотор TP1 и AOX1 (например, для применения в *Pichia*). Выбор соответствующего вектора и промотора находится в пределах компетенции специалиста в настоящей области техники.

Подходящие промоторы для применения в прокариотических клетках-хозяевах включают в себя без ограничения промотор РНК-полимеразы T7 бактериофага; промотор *trp*; промотор оперона *lac*; гибридный промотор, например гибридный промотор *lac/tac*, гибридный промотор *tac/trc*, промотор *trp/lac*, промотор T7/*lac*; промотор *trc*; промотор *tac* и подобное; промотор *araBAD*; такие *in vivo* регулируемые промоторы, как промотор *ssaG* или родственный промотор (смотрите, например, патентную публикацию США № 20040131637), промотор *pagC* (Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol., 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., PNAS, 1992; 89(21): 10079-83), промотор *nirB* (Harborne et al. (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813) и подобное (смотрите, 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 *sigma70*, например консенсусный промотор *sigma70* (смотрите, например, регистрационный номера GenBank AX798980, AX798961 и AX798183); промотор стационарной фазы, например промотор *dps*, промотор *spv* и подобное; промотор, происходящий из острова патогенности SPI-2 (смотрите, например, международную патентную публикацию WO 96/17951); промотор *actA* (смотрите, например, Shetron-Rama et al. (2002) Infect. Immun. 70:1087-1096); промотор *gpmM* (смотрите, например, Valdivia and Falkow (1996). Mol. Microbiol. 22:367); промотор *tet* (смотрите, например, Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) в Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, p. 143-162); промотор SP6 (смотрите, например, Melton et al. (1984) Nucl. Acids Res 12:7035) и подобное. Подходящие сильные промоторы для применения у таких прокариот, как *Escherichia coli*, включают в себя без ограничения *Trc*, *Tac*, *T5*, *T7* и *P_{Lambda}*. Не ограничивающие примеры операторов для применения в бактериальных клетках-хозяевах включают в себя оператор промотора лактозы (белок-репрессор LacI изменяет конформацию при контакте с лактозой, тем самым предотвращая связывание белка-репрессора LacI с оператором), оператор промотора триптофана (при создании комплекса с триптофаном белок-репрессор TrpR характеризуется конформацией, которая связывает оператор; при отсутствии триптофана белок-репрессор TrpR характеризуется конформацией, которая не связывается с оператором), и оператор промотора *tac* (смотрите, например, deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25).

Кодирующая заявленное антитело нуклеотидная последовательность может присутствовать в экспрессионном векторе и/или клонирующем векторе. Если заявленное антитело содержит два отдельных полипептида, нуклеотидные последовательности, кодирующие два полипептида, могут быть клонированы в один и тот же или отдельные векторы. Экспрессионный вектор может включать в себя селективируемый маркер, точку начала репликации и другие признаки, которые обеспечивают репликацию и/или поддержание вектора.

Большое количество подходящих векторов и промоторов известно специалистам в настоящей области техники; многие являются коммерчески доступными для создания заявленных рекомбинантных конструированных. Следующие векторы представлены для примера. Бактериальные: pBs, 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, как правило, содержат подходящие сайты рестрикции, расположенные вблизи промоторной последовательности для обеспечения вставки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих гетерологичные белки. Может присутствовать селективируемый маркер, действующий в хозяине экспрессии. Подходящие экспрессионные векторы включают в себя без ограничения вирусные векторы (например, вирусные векторы на основании вируса осповакцины; полиовируса; аденовируса (смотрите, например, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., Hum Gene Ther 5:1088 1097, 1999; международные патентные публикации №№ WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655); адено-ассоциированного вируса (смотрите, 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 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; вируса простого герпеса; вируса иммунодефицита человека (смотрите, например, Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); ретровирусный вектор (например, вирус лейкоза мышей, вирус некроза селезенки, и векторы, происходящие из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы) и подобное.

Как отмечено выше, заявленная нуклеиновая кислота содержит кодирующую заявленное антитело нуклеотидную последовательность. Заявленная нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR тяжелой и легкой цепей IPN001. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирую-

щую CDR тяжелой и легкой цепей IPN002, где кодирующие CDR последовательности чередуются с кодирующими FR нуклеотидными последовательностями. Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующие FR нуклеотидные последовательности представляют собой кодирующие FR нуклеотидные последовательности человека.

Клетки-хозяева.

Настоящее изобретение включает выделенные генетически модифицированные клетки-хозяева (например, клетки *in vitro*) которые являются генетически модифицированными с помощью заявленной нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленная выделенная генетически модифицированная клетка-хозяин может производить заявленное антитело.

Подходящие клетки-хозяева включают в себя такие эукариотические клетки-хозяева, как клетка млекопитающего, клетка-хозяин насекомого, дрожжевая клетка; и такие прокариотические клетки, как бактериальная клетка. Введение заявленной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина можно осуществить, например, с помощью осаждения фосфатом кальция, опосредованной DEAE декстраном трансфекции, опосредованной липосомами трансфекции, электропорации или другого известного способа.

Подходящие клетки млекопитающего включают в себя первичные клетки и иммортализованные клеточные линии. Подходящие клеточные линии млекопитающего включают в себя клеточные линии человека, клеточные линии не являющегося человеком примата, клеточные линии грызуна (например, мыши, крысы) и подобное. Подходящие клеточные линии млекопитающего включают в себя без ограничения клетки HeLa (например, регистрационный номер в Американской коллекции типовых культур (ATCC) № CCL-2), клетки CHO (например, №№ ATCC CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, № ATCC CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, № ATCC CRL-1658), клетки Huh-7, клетки BHK (например, № ATCC CCL10), клетки PC12 (№ ATCC CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (№ ATCC CRL1651), клетки RAT1, мышинные L клетки (№ ATCC CCL1.3), клетки эмбриональной почки человека (HEK) (№ ATCC CRL1573), клетки HLHerG2 и подобное. В некоторых случаях клетки представляют собой клетки HEK. В некоторых случаях клетки представляют собой клетки CHO, например клетки CHO-K1 (№ ATCC CCL-61), клетки CHO-M, клетки CHO-DG44 (№ ATCC PTA-3356) и подобное.

Подходящие дрожжевые клетки включают в себя 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*, *Khuyveromyces* sp., *Khuyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii*

и подобное.

Подходящие прокариотические клетки включают в себя без ограничения любую из разнообразных лабораторных штаммов *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp. и подобное; смотрите, например, Carrier et al. (1992) J. Immunol. 148:1176-1181; патент США № 6447784; и Sizemore et al. (1995) Science 270:299-302. Как правило, лабораторный штамм представляет собой штамм, который не является патогенным. Не ограничивающие примеры других подходящих бактерий включают в себя без ограничения *Bacillus subtilis* и подобное. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой *Escherichia coli*.

Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение включает композиции, включая в себя фармацевтические композиции, содержащие заявленное антитело. Как правило, композиция содержит эффективное количество заявленного антитела. "Эффективное количество" означает дозировку, достаточную для получения требуемого результата, например снижения неблагоприятного симптома, связанного с таупатией, уменьшения интенсивности симптома таупатии, замедления прогрессирования таупатии и т.д. Как правило, требуемый результат представляет собой, по меньшей мере, снижение проявления симптома таупатии по сравнению с контролем. Заявленное антитело может быть доставлено таким способом, чтобы избежать пересечения гематоэнцефалического барьера, как описано подробнее ниже. Заявленное антитело может быть составлено и/или модифицировано для обеспечения возможности пересечения антителом гематоэнцефалического барьера.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую: а) антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах N-концевой части Тау, причем антитело содержит: (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4

или SEQ ID NO: 10; (v) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, подходящее для введения человеку, причем композиция не содержит эндотоксины.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую: а) выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 полипептида Тау; и b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является подходящим для введения человеку.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую: А) выделенное антитело, содержащее гуманизованную каркасную область легкой цепи и гуманизованную каркасную область тяжелой цепи, причем выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида Тау с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и b) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и В) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является подходящим для введения человеку.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую:

А) выделенное антитело, причем антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab', и причем антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида Тау с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и b) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и В) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является подходящим для введения человеку.

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую: А) выделенное антитело, причем выделенное антитело содержит константную область легкой цепи человека и константную область тяжелой цепи человека, и причем выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области полипептида Тау с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и b) область тяжелой цепи, содержащую: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и В) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество является подходящим для введения человеку.

Составы.

В заявленных способах заявленное антитело может быть введено хозяину с применением любого подходящего средства, способного приводить к требуемому терапевтическому эффекту или диагностическому эффекту. Таким образом, средство может быть введено с помощью различных составов для терапевтического введения. Более конкретно, заявленное антитело может быть введено в композицию фармацевтических композиций путем комбинации с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и может быть введено в композицию препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингаляции и аэрозоли.

В фармацевтических лекарственных формах заявленное антитело может быть введено в форме своих фармацевтически приемлемых солей или они также могут использоваться отдельно или в соответствующей ассоциации, а также в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Следующие способы и вспомогательные вещества являются исключительно иллюстративными и не являются

ся ограничивающими в какой бы то ни было степени.

Для пероральных препаратов заявленное антитело может использоваться отдельно или в комбинации с соответствующими добавками для получения таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с такими общепринятыми добавками, как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; с такими связующими, как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с такими разрыхлителями, как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; с такими смазывающими средствами, как тальк или стеарат магния; и при необходимости с разбавителями, буферными средствами, увлажняющими средствами, консервантами и ароматизаторами.

Заявленное антитело может быть введено в композицию препаратов для инъекций путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие аналогичные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и при необходимости с такими общепринятыми добавками, как солюбилизаторы, изотонические средства, суспендирующие средства, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

Фармацевтические композиции, содержащие заявленное антитело, получают путем смешивания антитела, характеризующегося требуемой степенью чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами, стабилизаторами, поверхностно-активными веществами, буферами и/или средствами для поддержания тоничности. Приемлемые носители, вспомогательные вещества и/или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя такие буферы, как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая в себя аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин и лимонную кислоту; консерванты (такие как этанол, бензиловый спирт, фенол, m-крезол, p-хлор-m-крезол, метил- или пропилпарабены, бензалкония хлорид или их комбинации); такие аминокислоты, как аргинин, глицин, орнитин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин, пролин и их комбинации; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; низкомолекулярные (меньше чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; такие белки, как желатин или сывороточный альбумин; такие хелатирующие средства, как EDTA; такие сахара, как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, манноза, мальтоза, галактоза, фруктоза, сорбоза, раффиноза, глюкозамин, N-метилглюкозамин, галактозамин и нейраминавая кислота; и/или такие неионные поверхностно-активные вещества, как Tween, Brij Pluronic, Triton-X или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтическая композиция может находиться в жидкой форме, лиофилизированной форме или жидкой форме, разведенной из лиофилизированной формы, причем лиофилизированный препарат подлежит разведению стерильным раствором перед введением. Стандартная процедура для разведения лиофилизированной композиции заключается в добавлении объема чистой воды (как правило, эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации); тем не менее, растворы, содержащие антибактериальные средства, могут использоваться для получения фармацевтических композиций для парентерального введения; смотрите также Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54.

Иллюстративные концентрации антитела в заявленной фармацевтической композиции могут находиться в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 150 до приблизительно 200 мг/мл.

Водный состав антитела можно получить в pH-буферном растворе, например, при pH в диапазоне от приблизительно 4,0 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0, или, альтернативно, приблизительно 5,5. Примеры буферов, которые являются подходящими для pH в пределах указанного диапазона, включают в себя фосфатные, гистидиновые, цитратные, сукцинатные, ацетатные буферы и другие буферы на основе органических кислот. Концентрация буфера может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 100 мМ или от приблизительно 5 до приблизительно 50 мМ в зависимости, например, от буфера и требуемой тоничности состава.

Регулирующее тоничность средство могут быть включены в состав антитела для модулирования тоничности состава. Иллюстративные регулирующие тоничность средства включают в себя хлорид натрия, хлорид калия, глицерин и любой компонент из группы аминокислот, сахаров, а также их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления водный состав является изотоническим, хотя гипертонические или гипотонические растворы могут являться подходящими. Термин "изотонический" означает раствор, характеризующийся такой же тоничностью, как и другой раствор, с которым его сравнивают, такой как физиологический солевой раствор или сыворотка. Регулирующие тоничность средства можно использовать в количестве, составляющем от приблизительно 5 до приблизительно 350 мМ, например в количестве, составляющем 100 мМ-350 мМ.

Поверхностно-активное вещество также может быть добавлено к составу антител для снижения агрегации введенного в состав антитела и/или минимизации формирования частиц в составе и/или снижения адсорбции. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают в себя сложные эфиры полиоксипропиленсорбитана и жирной кислоты (Tween), простые эфиры полиоксиэтиленалкила (Brij), про-

стые эфиры алкилфенилполиоксиэтилена (Triton-X), сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена (Poloxamer, Pluronic) и додецилсульфат натрия (SDS). Примеры подходящих сложных эфиров полиоксипропилена и сорбитана и жирной кислоты представляют собой полисорбат 20 (продаваемый под торговым названием Tween 20™) и полисорбат 80 (продаваемый под торговым названием Tween 80™). Примеры подходящих сополимеров полиэтилена и полипропилена представляют собой соединения, продаваемые под торговыми названиями Pluronic® F68 или Poloxamer 188™. Примеры подходящих простых эфиров полиоксиэтиленалкила представляют собой соединения, продаваемые под торговым названием Brij™. Иллюстративные концентрации поверхностно-активного вещества могут находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 1% мас./об.

Также может быть добавлен лиопротектор для защиты нестабильного активного ингредиента (например, белка) от дестабилизирующих условий во время процесса лиофилизации. Например, известные лиопротекторы включают в себя сахара (включая в себя глюкозу и сахарозу); полиолы (включая в себя маннит, сорбит и глицерин) и аминокислоты (включая в себя аланин, глицин и глутаминовую кислоту). Лиопротекторы могут быть включены в количестве, составляющем приблизительно 10 мМ-500 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленный состав включает в себя заявленное антитело и один или несколько идентифицированных выше средств (например, поверхностно-активное вещество, буфер, стабилизатор, регулирующее тоничность средство) и, по существу, не содержит один или несколько консервантов, таких как этанол, бензиловый спирт, фенол, m-крезол, p-хлор-m-крезол, метил- или пропилпарабены, хлорид бензалкония и их комбинации. Согласно другим вариантам осуществления консервант включен в состав, например, в концентрациях в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 2% (мас./об.).

Например, заявленный состав может представлять собой жидкий или лиофилизированный состав, подходящий для парентерального введения, и может содержать приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/мл заявленного антитела; приблизительно 0,001 до приблизительно 1% по меньшей мере одного поверхностно-активного вещества; приблизительно 1 до приблизительно 100 мМ буфера; необязательно приблизительно 10 до приблизительно 500 мМ стабилизатора и приблизительно 5 до приблизительно 305 мМ регулирующего тоничность средства; и характеризуется pH приблизительно 4,0 до приблизительно 7,0.

В качестве другого примера заявленный парентеральный состав представляет собой жидкий или лиофилизированный состав, содержащий приблизительно 1 до приблизительно 200 мг/мл заявленного антитела; 0,04% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; и характеризуется pH, составляющим 5,5.

В качестве другого примера заявленный парентеральный состав содержит лиофилизированный состав, содержащий: 1) 15 мг/мл заявленного антитела; 0,04% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 2) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,04% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 3) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 4) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,04% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 6) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5.

В качестве другого примера заявленный парентеральный состав представляет собой жидкий состав, содержащий: 1) 7,5 мг/мл заявленного антитела; 0,022% Tween 20 мас./об.; 120 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 2) 37,5 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 10 мМ L-гистидина и 125 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 3) 37,5 мг/мл заявленного антитела; 0,01% Tween 20 мас./об.; 10 мМ L-гистидина и 125 мМ сахарозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 4) 37,5 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 10 мМ L-гистидина; 125 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 5) 37,5 мг/мл заявленного антитела; 0,01% Tween 20 мас./об.; 10 мМ L-гистидина и 125 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 6) 5 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 7) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ маннит; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 8) 75 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 140 мМ хлорида натрия; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 9) 150 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ трегалозы; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 10) 150 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ маннита; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 11) 150 мг/мл заявленного антитела; 0,02% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 140 мМ хлорида натрия; характеризуется pH, составляющим 5,5; или 12) 10 мг/мл заявленного антитела; 0,01% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина и 40 мМ хлорида натрия; характеризуется pH, составляющим 5,5.

Заявленное антитело может использоваться в аэрозольном составе для введения посредством ингаля-

ции. Заявленное антитело может быть введено в композицию в находящиеся под давлением приемлемые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и подобное.

Более того, заявленное антитело можно получить в виде суппозитория путем смешивания с разнообразными основами, такими как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Заявленное антитело может быть введено ректально посредством суппозитория. Суппозиторий может включать в себя такие инертные носители, как масло какао, карбовоски и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, но затвердевают при комнатной температуре.

Могут быть представлены такие стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, как сиропы, эликсиры и суспензии, причем каждая единица дозирования, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит установленное количество композиции, содержащей один или несколько ингибиторов. Аналогично, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать заявленное антитело в композиции в виде раствора в стерильной воде, нормальном солевом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе.

Используемый в настоящем документе термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных дозировок для субъектов-людей и животных, причем каждая единица содержит заданное количество антитела к Тау согласно настоящему изобретению, рассчитанное в количестве, достаточном для осуществления требуемого эффекта вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или инертной средой. Технические условия для заявленного антитела могут зависеть от конкретного используемого антитела и достигаемого эффекта и фармакодинамических показателей, связанных с каждым антителом в организме хозяина.

Другие способы введения также будут находить применение вместе со способом согласно настоящему изобретению. Например, заявленное антитело может быть введено в композицию суппозитория и в некоторых случаях аэрозольных и интраназальных композиций. Для суппозитория композиция инертного носителя будет включать в себя традиционные связующие средства и носители, такие как, полиалкиленгликоли или триглицериды. Такие суппозитории могут быть образованы из смесей, содержащих активный ингредиент в диапазоне, составляющем приблизительно 0,5 до приблизительно 10% (мас./мас.), например от приблизительно 1 до приблизительно 2%.

Интраназальные составы будут, как правило, включать в себя инертные носители, которые не вызывают раздражение слизистой носа, а также не оказывают существенного воздействия на функцию мерцательного эпителия. Могут быть использованы такие разбавители, как вода, водный солевой раствор или другие известные вещества. Назальные составы также могут содержать такие консерванты, как без ограничения хлорбутанол и бензалкония хлорид. Может присутствовать поверхностно-активное вещество для усиления абсорбции заявленного антитела слизистой носа.

Заявленное антитело может быть введено в виде состава для инъекций. Как правило, композиции для инъекций получают в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть использованы твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких инертных носителях перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован или антитело может быть инкапсулировано в липосомных инертных носителях.

Подходящие вспомогательные инертные носители представляют собой, например, воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол или подобное и их комбинации. Кроме того, при необходимости инертный носитель может содержать минорные количества таких дополнительных веществ, как смачивающие средства или эмульгаторы или регулирующие pH буферные средства. Фактические способы получения таких лекарственных форм являются известными или будут очевидными специалистам в настоящей области техники; смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985. Подлежащая введению композиция или состав будут в любом случае содержать количество заявленного антитела, адекватное для достижения требуемого состояния у подлежащего лечению субъекта.

Такие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как инертные носители, адъюванты, носители или разбавители, являются общедоступными. Более того, такие фармацевтически приемлемые дополнительные вещества, как регулирующие pH и буферные средства, регулирующие тоничность средства, стабилизаторы, смачивающие средства и подобное, являются общедоступными.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело вводят в состав контролируемого высвобождения. Препараты замедленного высвобождения могут быть получены с применением способов, хорошо известных в настоящей области техники. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем указанные матрицы находятся в форме профилированных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц замедленного высвобождения включают в себя сложные полиэфиры, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, не распадающийся этиленвинилацетат, гидрогели, полилактиды, распадающиеся сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Возможную потерю биологической активности и возможные изменения в иммуногенности антител, содержащихся в препаратах замедленного высвобождения,

ния, можно предотвратить путем применения соответствующих добавок, путем контроля содержания влаги и путем разработки специфических композиций полимерных матриц.

Контролируемое высвобождение в пределах объема настоящего изобретения может рассматриваться как означающее любую из множества лекарственных форм пролонгированного высвобождения. Следующие термины могут рассматриваться как, по существу, эквивалентные контролируемому высвобождению, для целей настоящего изобретения: непрерывное высвобождение, контролируемое высвобождение, замедленное высвобождение, депонированное, постепенное высвобождение, длительное высвобождение, программируемое высвобождение, пролонгированное высвобождение, пропорциональное высвобождение, затяннувшееся высвобождение, депо, задержанное, медленное высвобождение, высвобождение с интервалами, долговременное высвобождение, высвобождение с временными интервалами, отрегулированное по времени высвобождение, замедленное действие, продолжительное действие, действие с наложением по времени, длительное действие, пролонгированное действие, повторное действие, медленное действие, долговременное действие, лекарственные средства с замедленным действием и продолжительное высвобождение. Дополнительные обсуждения указанных терминов можно найти в Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms. 1987 (CRC Press, Inc.).

Различные технологии контролируемого высвобождения охватывают очень широкий спектр лекарственных форм. Технологии контролируемого высвобождения включают в себя без ограничения физические системы и химические системы.

Физические системы включают в себя без ограничения резервуарные системы с контролирующими скорость мембранами, такие как системы микроинкапсуляции, макроинкапсуляции и мембранные системы; резервуарные системы без контролирующих скорость мембран, такие как полые волокна, ультрамикропористая триацетатцеллюлоза и пористые полимерные субстраты и пены; монолитические системы, включая в себя такие системы, физически растворимые в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, не поддающиеся эрозии, поддающиеся эрозии, поддающиеся проникновению агентов окружающей среды и разлагаемые), и материалы, физически диспергированные в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, не поддающиеся эрозии, поддающиеся эрозии, поддающиеся проникновению агентов окружающей среды и разлагаемые); ламинированные структуры, включая в себя резервуарные слои, химически сходные или несходные с наружными контролирующими слоями; и другие физические способы, такие как осмотические насосы или адсорбция на ионообменных смолах.

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

Существует ряд лекарственных составов контролируемого высвобождения, которые разработаны для перорального введения. Они включают в себя без ограничения контролируемые осмотическим давлением гастроинтестинальные системы доставки; контролируемые гидродинамическим давлением гастроинтестинальные системы доставки; контролируемые проницаемостью мембран гастроинтестинальные системы доставки, которые включают в себя контролируемые проницаемостью микропористых мембран устройства гастроинтестинальной доставки; устойчивые к желудочному соку нацеленные на кишечник устройства контролируемого высвобождения для гастроинтестинальной доставки; гелевые контролируемые диффузией гастроинтестинальные системы доставки; и контролируемые ионным обменом гастроинтестинальные системы доставки, которые включают в себя катионные и анионные лекарственные средства. Дополнительную информацию в отношении системы доставки лекарственных средств контролируемого высвобождения можно найти в Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.).

Дозировки.

Подходящую дозировку может определить лечащий врач или другой квалифицированный медицинский персонал на основании различных клинических факторов. Как хорошо известно в медицинской области техники, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включающих в себя параметры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное подлежащее введению соединение, пол пациента, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимы одновременно. Заявленное антитело может быть введено в количествах, составляющих 1 нг/кг массы тела-20 мг/кг массы тела на дозу, например 0,1-10 мг/кг массы тела, например 0,5-5 мг/кг массы тела; тем не менее, предусмотрены дозы, ниже или выше указанного иллюстративного диапазона, особенно принимая во внимание вышеупомянутые факторы. Если схема представляет собой непрерывную инфузию, она может также находиться в диапазоне от 1 мкг до 10 мг на 1 кг массы тела в 1 мин.

Специалистам будет понятно, что уровни дозы могут варьировать в зависимости от конкретного антитела, тяжести симптомов и подверженности субъекта побочным эффектам. Предпочтительные дозировки для заданного соединения легко определяются специалистами в настоящей области техники с помощью разнообразных способов.

Пути введения.

Заявленное антитело вводят индивидууму с применением любого доступного способа и пути, подходящего для доставки лекарственного средства, включая в себя *in vivo* и *ex vivo* способы, а также системные и локализованные пути введения.

Общепринятые и фармацевтически приемлемые пути введения включают в себя интраназальный, внутримышечный, интратрахеальный, интратекальный, подкожный, интрадермальный путь, местное нанесение, внутривенный, интраартериальный, ректальный, назальный, пероральный путь и другие энтеральный и парентеральные пути введения. Пути введения можно комбинировать при необходимости или регулировать в зависимости от антитела и/или требуемого эффекта. Заявленная композиция антитела может быть введена в одной дозе или в множественных дозах. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят посредством ингаляционного пути. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят интраназально. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят местно. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят интракраниально. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления заявленную композицию антитела вводят интратекально.

Антитело согласно настоящему изобретению могут быть введены хозяину с применением любых доступных общепринятых способов и путей, подходящих для доставки общепринятых лекарственных средств, включая в себя системные или локализованные пути. Как правило, пути введения, предусмотренные настоящим изобретением, включают в себя без ограничения энтеральный, парентеральный или ингаляционный пути.

Парентеральные пути введения, отличные от ингаляционного введения, включают в себя без ограничения местный, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, интраорбитальный, интракапсулярный, интраспинальный, интратеральный, интратекальный и внутривенный пути, т.е. любой путь введения, отличный от прохождения через желудочно-кишечный тракт. Парентеральное введение может быть проведено для достижения системной или локальной доставки заявленного антитела. Если необходима системная доставка, введение, как правило, включает инвазивное или системно абсорбированное местное введение фармацевтических препаратов или введение фармацевтических препаратов через слизистую оболочку.

Заявленное антитело также может быть доставлено субъекту путем энтерального введения. Энтеральные пути введения включают в себя без ограничения пероральную и ректальную (например, с применением суппозитория) доставку.

Под лечением подразумевают, по меньшей мере, уменьшение интенсивности симптомов, связанных с патологическим состоянием, поражающим хозяина, где уменьшение интенсивности используется в широком смысле для обозначения, по меньшей мере, снижения величины параметра, например симптома, связанного с подлежащим лечению патологическим состоянием, таким как таупатия. В связи с этим, лечение также включает в себя ситуации, где патологическое состояние или, по меньшей мере, связанные с ним симптомы, полностью ингибируются, например происходит предотвращение их возникновения, или прекращаются, например заканчиваются, так что хозяин больше не страдает от патологического состояния или, по меньшей мере, симптомов, которые характеризуют патологическое состояние.

Согласно некоторым вариантам осуществления заявленное антитело вводят путем инъекции и/или доставки, например, в область в артерии головного мозга или напрямую в ткань головного мозга. Заявленное антитело также может быть введено напрямую в целевую область, например, путем биобаллистической доставки в целевую область.

Разнообразные хозяева (причем термин "хозяин" используется взаимозаменяемо в настоящем документе с терминами "субъект", "индивидуум" и "пациент") поддаются лечению в соответствии с заявленными способами. Как правило, такие хозяева представляют собой "млекопитающих" или "относящегося к млекопитающим", причем указанные термины используются в широком смысле для описания организмов, которые находятся в пределах класса млекопитающие, включая в себя отряды плотоядных (например, собак и кошек), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс) и приматов (например, людей, шимпанзе и нечеловекообразных обезьян). Согласно некоторым вариантам осуществления хозяева будут представлять собой людей.

Предусмотрены наборы со стандартными дозами заявленного антитела, например, в пероральных дозах или дозах для инъекций. В таких наборах в дополнение к контейнерам, содержащим стандартные дозы, будет находиться информационный листок-вкладыш, в котором описано применение и сопровождающие благоприятные эффекты антитела в лечении представляющего интерес патологического состояния. Предпочтительные соединения и стандартные дозы являются такими, как описано в настоящем документе выше.

Способы обнаружения.

Настоящее изобретение включает *in vitro* способы обнаружения полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума; и способы обнаружения полипептида Тау в живом индивидууме *in*

vivo. Заявленный *in vitro* способ обнаружения может являться количественным. Тау может, таким образом, служить биомаркером для прогрессирования таупатии или ответа на лечение таупатии.

Полипептид Тау, который обнаруживают/количественно определяют, может представлять собой: а) полноразмерный Тау; b) N-концевой фрагмент полноразмерного Тау; c) общий Тау, где "общий Тау" может включать в себя полноразмерный Тау любой изоформы; d) свободный Тау, например Тау, который не связан с заявленным антителом к Тау; и e) любые N-концевые фрагменты Тау, которые присутствуют в биологическом образце и которые проявляют эпитоп, распознанный заявленным антителом к Тау. Аминокислотные последовательности полноразмерного Тау человека представлены на фиг. 6A-D.

В некоторых случаях заявленный способ обнаружения может дополнительно включать определение содержания Аβ40 и/или Аβ42 в биологическом образце. Определение содержания Аβ40 и/или Аβ42 в биологическом образце может быть проведено с применением иммунологического анализа (например, ELISA), например с применением антитела, которое связывает Аβ40 и/или Аβ42.

Подходящие биологические образцы включают в себя, например, спинномозговую жидкость, кровь, плазму, сыворотку, мочу и слюну.

Согласно настоящему изобретению *in vitro* способ обнаружения полипептида Тау в биологическом образце, полученном у индивидуума, как правило, включает: а) приведение биологического образца в контакт с описанным в настоящем документе антителом к Тау и b) обнаружение связывания антитела с полипептидом Тау, присутствующим в образце. В некоторых случаях антитело к Тау содержит CDR VH и/или VL, представленные на фиг. 1A и 1B. В некоторых случаях антитело к Тау содержит CDR VH и/или VL, представленные на фиг. 2A и 2B.

Способ обнаружения согласно настоящему изобретению может использоваться для определения того, присутствуют ли у индивидуума таупатии или он характеризуется риском развития таупатии. Способ обнаружения согласно настоящему изобретению может использоваться для определения стадии (тяжести) таупатии. Способ обнаружения согласно настоящему изобретению может использоваться для определения ответа пациента на схему лечения для лечения таупатии. Биологический образец может быть протестирован с применением заявленного способа обнаружения, причем биологический образец получают от индивидуума, у которого подозревают наличие таупатии, индивидуума, у которого была диагностирована таупатия, индивидуума с генетической предрасположенностью к развитию таупатии и т.д.

Настоящее изобретение включает способ диагностики нейродегенеративной таупатии у индивидуума. Способ, как правило, включает: (а) оценку содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума; и (b) сравнение содержания полипептида Тау с эталонным, стандартным или нормальным контрольным значением, которое показывает содержание Тау у нормальных контрольных субъектов. Значимое различие между содержанием полипептида Тау в биологическом образце и нормальным контрольным значением указывает на то, что индивидуум характеризуется наличием нейродегенеративной таупатии.

Настоящее изобретение включает способ мониторинга прогрессирования или мониторинга ответа на лечение нейродегенеративной таупатии у индивидуума. Способ, как правило, включает сравнение содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума в первый момент времени, с содержанием полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума во второй момент времени. Различие в содержании полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума во второй момент времени, по сравнению с содержанием полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума в первый момент времени, может обеспечивать указание на то: i) прогрессирует ли таупатия или прогрессирование заболевания остановилось; и/или ii) как быстро прогрессирует таупатия; и/или iii) проявляет ли индивидуум благоприятный клинический ответ на лечение с помощью лекарственного средства или другой схемы лечения для лечения таупатии.

Настоящее изобретение включает способ определения стадии таупатии. Например, заявленный способ может обеспечивать определение стадии болезни Альцгеймера. Например, содержание полипептида Тау в биологическом образце (например, CSF или другом жидком биологическом образце) от живого индивидуума может обеспечивать указание на стадию AD согласно Braak; Braak and Braak (1995) *Neurobiol. Aging* 16:271. Например, содержание полипептида Тау в биологическом образце от живого индивидуума может обеспечивать указание на то, находится ли индивидуум на I-II транстенториальных стадиях AD; III-IV лимбических стадиях AD или V-VI неокортикальных стадиях AD.

Содержание полипептида Тау в биологическом образце можно оценить с помощью любого подходящего способа, известного в настоящей области техники. Подходящие способы включают в себя без ограничения белковый ("вестерн") блоттинг, иммунопреципитацию, иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), двухмерный гель-электрофорез, масс-спектроскопию (MS), матрично-активированную времяпролетную лазерную десорбцию/ионизацию-MS (MALDI-TOF), усиленную поверхностью времяпролетную лазерную десорбцию/ионизацию (SELDI-TOF), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), жидкостную экспресс-хроматографию белков (FPLC), многомерную жидкостную хроматографию (LC) с

последующей tandemной масс-спектрометрией (MS/MS) и лазерную денситометрию.

Настоящее изобретение включает способ мониторинга прогрессирования таупатии у индивидуума, причем способ, как правило, включает: а) определение первого содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума в первый момент времени; б) определение второго содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума во второй момент времени; и с) сравнение второго содержания Тау с первым содержанием Тау. Стадии определения могут включать: i) приведение в контакт биологического образца с заявленным антителом к Тау и ii) количественное определение связывания антитела с полипептидом Тау, присутствующим в образце.

В некоторых случаях первый момент времени представляет собой момент времени до начала схемы лечения, и второй момент времени представляет собой момент времени после начала схемы лечения. Таким образом, настоящее изобретение включает способ мониторинга ответа на лечение с помощью средства, которое лечит таупатию, причем способ включает: а) определение первого содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума в первый момент времени, то есть до начала лечения с помощью средства для лечения таупатии; б) определение второго содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума во второй момент времени, то есть после начала лечения с помощью средства для лечения таупатии; и с) сравнение второго содержания Тау с первым содержанием Тау.

Заявленный способ мониторинга прогрессирования таупатии также можно применять в отношении способов мониторинга прогрессирования синуклеопатии, например болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т.д. Например, прогрессирование PD с деменцией (PDD) можно подвергать мониторингу с помощью заявленного способа.

При некоторых таупатиях содержание Тау увеличивается с прогрессированием заболевания. При других таупатиях содержание Тау снижается с прогрессированием заболевания. Таким образом, например, содержание Тау увеличивается с прогрессированием AD и снижается с прогрессированием FTD.

Заявленный способ может включать применения набора или аналитического устройства, содержащего заявленное антитело к Тау. Настоящее изобретение включает наборы и аналитические устройства для проведения способа, описанного в настоящем документе. Заявленный набор включает в себя антитело к Тау согласно настоящему изобретению.

Антитело к Тау может быть иммобилизовано на нерастворимой подложке (например, индикаторной полоске, лунке многолуночного планшета, грануле (например, магнитной грануле) и т.д.). Подходящие подложки хорошо известны в настоящей области техники и содержат среди прочего коммерчески доступные материалы колонок, полистирольные гранулы, латексные гранулы, магнитные гранулы, частицы коллоидных металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембраны, листы, лунки реакционных пластинок (например, многолуночные планшеты), пластиковые пробирки и т.д. Твердая подложка может содержать любое из многочисленных веществ, включая в себя, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, естественные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Подходящие способы для иммобилизации заявленного антитела на твердой подложке хорошо известны и включают в себя без ограничения ионные, гидрофобные, ковалентные взаимодействия и подобное. Твердые подложки могут являться растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящая твердая подложка, является, как правило, нерастворимой в водном растворе.

Антитело к Тау согласно настоящему изобретению может содержать обнаруживаемую метку. Если антитело содержит обнаруживаемую метку, заявленный набор может включать в себя один или несколько реагентов для выявления обнаруживаемой метки. Меченое антитело может содержать такую метку, как хемилюминесцентное средство, дисперсная метка, колориметрическое средство, средство переноса энергии, фермент, флуоресцентное средство или радиоактивный изотоп. Подходящие обнаруживаемые метки включают в себя любую композицию, обнаруживаемую с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, электрических, оптических или химических средств. Подходящие обнаруживаемые метки включают в себя без ограничения флуоресцентные метки (например, изотиоцианат, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и подобное); радиоактивные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P) и ферменты (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, люцифераза и другие ферменты, которые действуют на субстрат с получением продукта, который может быть обнаружен с помощью флуорометрических, колориметрических или спектрофотометрических средств).

Заявленный набор может дополнительно включать в себя один или несколько дополнительных компонентов, причем подходящие дополнительные компоненты включают в себя: 1) положительный контроль; 2) буфер (например, буфер для связывания; отмывочный и т.д.); 3) реагенты для применения в создании обнаруживаемого сигнала и подобное. Другие необязательные компоненты набора включают в себя ингибитор протеазы; обнаруживаемую метку и т.д. Различные компоненты набора могут присутствовать в отдельных контейнерах или определенные совместимые компоненты могут быть предварительно скомбинированы в отдельном контейнере при необходимости.

В дополнение к вышеупомянутым компонентам заявленный набор может включать в себя инструкции для применения компонентов набора для практического осуществления заявленного способа. Инструкции для практического осуществления заявленного способа, как правило, записаны на подходящем носителе информации. Например, инструкции могут быть распечатаны на таком носителе, как бумага или пластик и т.д. В связи с этим, инструкции могут присутствовать в наборах в виде листка-вкладыша, на этикетке контейнера набора или его компонентов (т.е. связанной с упаковкой или внутренними упаковками) и т.д. Согласно другим вариантам осуществления инструкции присутствуют в виде электронного файла хранения данных, присутствующего на подходящем машиночитаемом носителе информации, например компакт-диске для однократной записи данных (CD-ROM), универсальном цифровом диске (DVD), дискете и т.д. Согласно другим вариантам осуществления предусмотрено, что настоящие инструкции не присутствуют в наборе, но предназначены для получения инструкций из удаленного источника, например через Интернет. Пример настоящего варианта осуществления представляет собой набор, который включает в себя веб-адрес, по которому можно просмотреть инструкции и/или с которого можно загрузить инструкции. Как и в случае с инструкциями, это средство для получения инструкций записано на подходящем носителе.

Аналитическое устройство может включать в себя заявленное антитело к Тау, иммобилизованное на твердом субстрате. Аналитическое устройство может находиться в любом из разнообразных форматов, например в виде индикаторной полоски, зонда и т.д.

Визуализация *in vivo*.

Как обсуждалось выше, настоящее изобретение включает способы обнаружения полипептида Тау у живого индивидуума, например, с помощью техники *in vivo* визуализации. Например, согласно одному варианту осуществления *in vivo* визуализацию полипептида Тау можно осуществить с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной эмиссионной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближней ИК-области спектра (NIR) или магнитно-резонансной визуализации (MRI). Заявленное антитело к Тау вводят индивидууму и обнаруживают присутствие и/или содержание полипептида Тау. Антитело к Тау может содержать метку, подходящую для применения в PET, SPECT, NIR или MRI. Такие метки включают в себя контрастное средство или радиоактивный изотоп, причем контрастное средство или радиоактивный изотоп представляют собой средство, которое является подходящим для применения в визуализации, например процедурах визуализации, проводимых на людях, как описано выше. В некоторых случаях антитело к Тау содержит CDR VH и/или VL IPN001. В некоторых случаях антитело к Тау содержит CDR VH и/или VL IPN002. Антитело к Тау может содержать одну или несколько гуманизированных каркасных областей, описанных выше.

Создание отчета.

В некоторых случаях заявленный способ обнаружения включает обнаружение полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума; и основанное на содержании обнаруженного полипептида Тау создание отчета и/или определение тактики терапии или ведения индивидуума, от которого был получен биологический образец.

Отчет может включать в себя один или несколько из следующего: указание на вероятность наличия у индивидуума таупатии; указание на тяжесть таупатии; указание на то, проявляет ли индивидуум благоприятный клинический ответ на лечение для таупатии; и подобное.

Таким образом, отчет может включать в себя такую информацию, как спрогнозированную вероятность того, что индивидуум характеризуется наличием или будет развивать таупатию; рекомендацию относительно дополнительной оценки; рекомендацию в отношении терапевтического лекарственного средства и/или другого вмешательства для ведения пациентов; и подобное.

Например, способы, раскрытые в настоящем документе могут дополнительно включать стадию создания или предоставления отчета, обеспечивающего результаты оценки субъекта, причем отчет может быть предоставлен в форме электронного носителя (например, электронного отображения на мониторе компьютера), или в форме материального носителя (например, отчет, распечатанный на бумаге или другом материальном носителе). Оценка в отношении вероятности того, есть ли у индивидуума таупатия или он характеризуется риском развития, имеет название "отчет в отношении риска", "балл оценки риска" или "балл оценки вероятности". Индивидуум или организация, которая готовит отчет ("создатель отчета") также может проводить такие стадии, как забор образца, обработка образца и подобное. Альтернативно, организация, отличная от создателя отчета, может проводить такие стадии, как забор образца, обработка образца и подобное. Отчет оценки риска может быть предоставлен пользователю. "Пользователь" может являться специалистом в области здравоохранения (например, практикующим врачом, лаборантом или лечащим врачом).

Руководство в отношении тактики ведения пациентов.

В некоторых случаях заявленный способ обнаружения включает обнаружение полипептида Тау в биологическом образце, полученном от индивидуума; и на основании содержания обнаруженного полипептида Тау создание отчета и/или определение тактики терапии или ведения индивидуума, от которого был получен биологический образец.

Таким образом, например, в зависимости от результата заявленного способа обнаружения может

быть сделана рекомендация в отношении того, что индивидуум подвергается терапевтическому вмешательству (лечению) в отношении таупатии и/или что индивидуум рассматривается в качестве претендента для специального ведения пациентов.

Терапевтическое вмешательство может включать, например, лекарственную терапию для лечения болезни Альцгеймера. Примеры лекарственной терапии для лечения болезни Альцгеймера включают в себя без ограничения ингибиторы ацетилхолинэстеразы, включая в себя без ограничения Aricept (донепезил), Exelon (ривастигмин), метрифонат и такрин (Cognex); антитело к Аβ (например, соланезумаб); антитело к Тау; нестероидные противовоспалительные средства, включая в себя без ограничения ибупрофен и индометацин; такие ингибиторы циклооксигеназы-2 (Cox2), как Celebrex; и такие ингибиторы моноаминоксидазы, как селегилин (Eldepryl или Deprenyl). Дозировки каждого из вышеприведенных средств известны в настоящей области техники. Например, Aricept может быть введен в дозе 50 мг перорально в день в течение 6 недель и, если он хорошо переносится индивидуумом, в дозе 10 мг в день после этого.

Определение количества свободного и связанного внеклеточного Тау.

После введения антитела к еТау индивидууму может представлять интерес определение количества еТау, оставшегося в CSF или ISF, который не связан с антителом к еТау. Настоящее изобретение включает способы определения количества такого свободного еТау. Схематическое представление способа определения количества еТау, оставшегося в CSF или ISF, который не связан с антителом к еТау, представлено на фиг. 54A. После введения антитела к еТау индивидууму может представлять интерес определение количества еТау в CSF или ISF, который связан с антителом к еТау.

Схематическое представление способа определения количества еТау в CSF или ISF, который связан с антителом к еТау, представлен на фиг. 54B.

Определение количества свободного внеклеточного Тау.

Настоящее изобретение включает способ определения количества внеклеточного Тау (еТау), несвязанного с антителом к еТау в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТау. Способ, как правило, включает: а) приведение в контакт иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, причем иммобилизованное антитело конкурирует за связывание с еТау с антителом к еТау, введенным субъекту, и при этом приведение в контакт происходит в условиях, подходящих для связывания несвязанного еТау с иммобилизованным антителом; и б) определение количества еТау, связанного с иммобилизованным антителом. Количество еТау, связанного с иммобилизованным антителом, представляет собой индикатор количества еТау, несвязанного с антителом к Тау в образце. В некоторых случаях количество еТау, связанного с иммобилизованным антителом, определяют с применением меченого обнаруживаемым способом третьего антитела, которое не конкурирует с иммобилизованным антителом за связывание с еТау.

Как указано выше, в анализе измеряют количество еТау в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТау. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой терапевтическое гуманизованное антитело к еТау. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой гуманизованное антитело к еТау согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТау, несвязанного с антителом к еТау в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТау, описанного выше; и б) определение содержания общего tau в образце.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТау, несвязанного с антителом к еТау в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТау, описанного выше; и б) сравнение содержания несвязанного Тау в образце с содержанием общего tau в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума до лечения с помощью антитела к еТау.

Заявленный способ обнаружения является подходящим для определения содержания внеклеточного tau. Используемый в настоящем документе термин "внеклеточный tau" ("еТау") включает любой полипептид Тау, который может быть обнаружен в спинномозговой жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой полипептид, характеризующийся длиной, составляющей 175 аминокислот, и содержащий аминокислоты 2-176 полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой полипептид, характеризующийся длиной, составляющей 171 аминокислоту, и содержащий аминокислоты 2-172 полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой еТау-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой еТау-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам осуществления еТау представляет собой еТау-4 поли-

пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых случаях полипептид еТau характеризуется длиной, составляющей от приблизительно 50 до приблизительно 175 аминокислот, например от приблизительно 50 аминокислот (aa) до приблизительно 75 aa, от приблизительно 75 до приблизительно 100 aa, от приблизительно 100 до приблизительно 125 aa, от приблизительно 125 до приблизительно 150 aa или от приблизительно 150 до приблизительно 175 aa; и может содержать от 50 до приблизительно 75, от приблизительно 75 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 125, от приблизительно 125 до приблизительно 150 или от приблизительно 150 до приблизительно 175 смежных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного tau. Иллюстративные полипептиды еТau представлены на фиг. 20.

Определение количества внеклеточного Тау, связанного с антителом к еТau.

Настоящее изобретение включает способ определения количества еТau, связанного с терапевтическим антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью терапевтического антитела к еТau. Способ, как правило, включает: а) приведение в контакт иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, причем иммобилизованное антитело не конкурирует за связывание с еТau с антителом к еТau, введенным субъекту, причем указанное приведение в контакт происходит при условиях, подходящих для связывания связанного с терапевтическим антителом еТau с иммобилизованным антителом; и б) определение количества комплекса терапевтического антитела к еТau/еТau, связанного с иммобилизованным антителом, причем количество комплекса терапевтического антитела к еТau/еТau, связанного с иммобилизованным антителом, представляет собой показатель количества связанного с терапевтическим антителом еТau, присутствующего в образце. Количество комплекса терапевтического антитела к еТau/еТau, связанного с иммобилизованным антителом, определяют путем обнаружения антитела к еТau, присутствующего в комплексе антитела к еТau/еТau. Количество связанного с иммобилизованным антителом комплекса терапевтического антитела к еТau/еТau, которое определяют путем обнаружения антитела к еТau, присутствующего в комплексе антитела к еТau/еТau, представляет собой показатель количества Тау, связанного с терапевтическим антителом в образце CSF или ISF.

Как указано выше, в анализе измеряют количество связанного с терапевтическим антителом еТau в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau. В некоторых случаях антитело к еТau представляет собой терапевтическое гуманизованное антитело к еТau. В некоторых случаях антитело к еТau представляет собой гуманизованное антитело к еТau согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к еТau представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и б) определение содержания общего tau в образце. В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и б) определение количества еТau в образце CSF или ISF, который не связан с терапевтическим антителом к еТau. В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; б) определение содержания общего tau в образце и с) определение количества еТau в образце CSF или ISF, который не связан с терапевтическим антителом к еТau.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и б) сравнение содержания Тау, связанного с антителом к еТau, в образце с содержанием общего tau в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума до лечения с помощью антитела к еТau.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, несвязанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; б) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и с) сравнение содержания несвязанного Тау и содержания Тау, связанного с антителом к еТau, в образце с содержанием общего tau в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума до лечения с помощью антитела к еТau.

Заявленный способ обнаружения является подходящим для определения содержания внеклеточного tau, связанного с терапевтическим антителом. Используемый в настоящем документе термин "внеклеточный tau" ("еТau") включает любой полипептид Тау, который может быть обнаружен в спинномозговой жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой полипептид, характеризующийся длиной, составляющей 175 аминокислот, и содержащий аминокислоты 2-176 полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой полипептид характеризующийся длиной, составляющей 171 аминокислоту, и содержащий аминокислоты 2-172 полноразмерного tau; например, согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой еТau-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой еТau-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам осуществления еТau представляет собой еТau-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых случаях полипептид еТau характеризуется длиной, составляющей от приблизительно 50 до приблизительно 175 аминокислот, например от приблизительно 50 аминокислот (aa) до приблизительно 75 aa, от приблизительно 75 до приблизительно 100 aa, от приблизительно 100 до приблизительно 125 aa, от приблизительно 125 до приблизительно 150 aa или от приблизительно 150 до приблизительно 175 aa; и может содержать от 50 до приблизительно 75, от приблизительно 75 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 125, от приблизительно 125 до приблизительно 150 или от приблизительно 150 до приблизительно 175 смежных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного tau. Иллюстративные полипептиды еТau представлены на фиг. 20.

Создание отчета.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, несвязанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и б) создание отчета и/или Руководство терапии или ведения индивидуума, от которого был получен образец. В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, несвязанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; б) сравнение содержания несвязанного Tau в образце с содержанием общего tau в образце CSF или ISF, полученный от индивидуума до лечения с помощью антитела к еТau; и в) создание отчета и/или определение тактики терапии или ведения индивидуума, от которого был получен образец.

В некоторых случаях заявленный способ будет включать: а) определение количества еТau, связанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и б) создание отчета с результатами определения. Отчет может дополнительно включать в себя сравнение одного или обоих количеств несвязанного Tau в образце с содержанием общего tau в образце CSF или ISF, после лечения с помощью антитела к еТau; и количеством общего Tau в образце CSF или ISF, полученном от индивидуума до лечения с помощью антитела к еТau.

Отчет может включать в себя, например, указание на то, проявляет ли индивидуум благоприятный клинический ответ на лечение таупатии; указание на то, нужно ли поддерживать, увеличивать или снижать дозировку антитела к еТau; и подобное.

Таким образом, отчет может включать в себя такую информацию, как рекомендация в отношении дополнительной оценки; рекомендация в отношении терапевтического лекарственного средства и/или другого вмешательства для ведения пациента; рекомендация увеличить дозировку антитела к еТau; рекомендация сохранить дозировку антитела к еТau; рекомендация снизить дозировку антитела к еТau; и подобное.

Например, раскрытые в настоящем документе способы могут дополнительно включать стадию создания или предоставления отчета с результатами оценки субъекта, причем отчет может быть предоставлен в форме электронного носителя (например, электронного отображения на мониторе компьютера), или в форме материального носителя (например, отчет, распечатанный на бумаге или другом материальном носителе). Индивидуум или организация, которая готовит отчет ("создатель отчета"), также может проводить такие стадии, как забор образца, обработка образца и подобное. Альтернативно, организация, отличная от создателя отчета, может проводить такие стадии, как забор образца, обработка образца и подобное. Отчет оценки риска может быть предоставлен пользователю. "Пользователь" может являться специалистом в области здравоохранения (например, практикующим врачом, лаборантом или лечащим врачом).

Руководство в отношении тактики ведения пациентов.

В некоторых случаях заявленный способ включает: а) определение количества еТau, несвязанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и на основании определенного количества еТau, несвязанного с антителом к еТau, создание отчета и/или определение тактики терапии или ведения индивидуума, от которого был получен биологический образец.

В некоторых случаях заявленный способ содержит: а) определение количества еТau, несвязанного с антителом к еТau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еТau, описанного выше; и на основании определенного количества еТau, несвязанного с анти-

телом к еTau, сохранение дозировки вводимого субъекту антитела к еTau. В некоторых случаях заявленный способ содержит: а) определение количества еTau, несвязанного с антителом к еTau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еTau, описанного выше; и на основании определенного количества еTau, несвязанного с антителом к еTau, увеличение дозировки вводимого субъекту антитела к еTau. В некоторых случаях заявленный способ содержит: а) определение количества еTau, несвязанного с антителом к еTau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, подвергающегося терапии с помощью антитела к еTau, описанного выше; и на основании определенного количества еTau, несвязанного с антителом к еTau, уменьшение дозировки вводимого субъекту антитела к еTau.

Примеры

Следующие примеры представлены для предоставления специалистам в настоящей области техники полного раскрытия и описания того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, и не предусмотрено, что они ограничивают объем того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением, а также не предусмотрено, что они представляют то, что описанные ниже эксперименты представляют собой все проведенные или единственные проведенные эксперименты. Были предприняты попытки подтвердить точность в отношении используемых значений (например, количеств, температуры и т.д.), но следует принимать во внимание некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой усредненную молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия и давление является атмосферным или близко к нему. Могут использоваться стандартные сокращения, например п.н. - пара(ы) нуклеотидов; т.п.н. - тысяча(и) пар нуклеотидов; пл - пиколитр(ы); с или сек - секунда(ы); мин - минута(ы); ч - час(ы); аа - аминокислота(ы); т.п.н. - тысяча(и) пар нуклеотидов; п.н. - пара(ы) нуклеотидов; н - нуклеотид(ы); в/м - внутримышечное(но); и/п - интраперитонеальное(но); п/к - подкожное(но) и подобное.

Пример 1. Клонирование и секвенирование областей VH и VL IPN001 и IPN002.

Определяли аминокислотные последовательности областей VH и VL антител IPN001 (также имеющие название в настоящем документе "IPN1" или "IPN-1") и антител IPN002 (также имеющие название в настоящем документе "IPN2" или "IPN-2"). Аминокислотные последовательности областей VH и VL IPN001 представлены на фиг. 1А и 1В соответственно. Аминокислотные последовательности областей VH и VL IPN002 представлены на фиг. 2А и 2В соответственно. CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. CDR определяли с применением способа Kabat et al. (смотрите табл. 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 эффекта антител к Тау.

Материалы и способы.

Точечную фиксацию потенциала на целой клетке от полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) кортикальных нейронов, культивированных на монослое нормальных астроцитов человека, проводили с применением пэтч-пипетки (2-5 MOhm), заполненной раствором, содержащим (мМ) К-метилсульфат (140), NaCl (10), CaCl₂ (1), Mg-АТФ (3); Na-GTP (0,4), EGTA (0,2), HEPES (10), фосфокреатин с доведенным pH 7,3 и мОсм = 300. Нейроны подвергали перфузии (2 мл/мин) с искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ) NaCl (140), KCl (2,5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), HEPES (10), D-глюкозу (10), сахарозу (20). Доведенный pH 7,4, мОсм = 310. Регистрацию данных проводили с применением программного обеспечения для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). AD tau и AD Tau, предварительно проинкубированные с IPN001 или IPN002 (2 ч при комнатной температуре или 24 ч при 4°C при массовом соотношении 10:1), наносили посредством системы для микроинфузии MinisQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме офлайн с применением программного обеспечения для анализа Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Регистрацию всех данных проводили при комнатной температуре.

Результаты.

Данные представлены на фиг. 3А-Д.

Нанесение AD-Тау (6 мкг/мл) вызывает деполяризацию мембраны кортикальных нейронов (А, В и С). Предварительная инкубация AD-Тау (6 мкг/мл) с IPN001 (60 мкг/мл) (А) или IPN002 (60 мкг/мл) (В) в течение >2 ч снижает опосредованную AD-Тау деполяризацию мембраны. С. Предварительная инкубация AD-Тау (6 мкг/мл) с IgG мыши (60 мкг/мл) не снижает опосредованную AD-Тау деполяризацию мембраны в кортикальных нейронах. D. Данные, обобщенно показывающие, что IPN001 и IPN002 значительно снижали опосредованную AD-Тау деполяризацию мембраны (парный t-критерий * p<0,037; ** p<0,009, p<0,003).

Пример 3. Иммунореактивность IPN001 и IPN002 с Тау в CSF от пациентов с AD.

Спинальную жидкость (CSF) объединяли от 10 здоровых доноров (по 1 мл от каждого). CSF также объединяли от 10 пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) (по 1 мл от каждого). Аликвоты пулов CSF сохраняли для анализа ELISA. Использовали 10 мл кондиционированных сред от кортикальных нейронов, подвергнутых дифференциации в течение 315 дней из линии индуцированных плюрипотент-

ных стволовых клеток Дайна (iPSC) (8941.1) в качестве контроля для проведения аффинного выделения CSF, и аликвоту также сохраняли для анализа ELISA. Для определения того, содержит ли CSF IPN002-реактивный Тау, каждый из объединенных образцов CSF и кондиционированных сред предварительно очищали на связанной с IgG1 смоле и фильтрат впоследствии наносили на связанную с IPN001 смолу. Смолы IPN001 тщательно отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и связанные белки элюировали с помощью 50 мМ глицина, 150 мМ NaCl, pH 2,3 и нейтрализовали с помощью 1 М трис, pH 8,3 после элюирования. Элюированные белки концентрировали на концентраторах YM10 и добавляли к буферу для образца для электрофореза в полиакриламидном геле с применением додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга.

Для определения того, реагирует ли IPN002 с любой формой Тау в CSF, вестерн-блоты элюированного белка IPN002 зондировали с помощью IPN001, Santa Cruz Tau H-150 (aa 1-150) и с помощью антитела к Тау #A0024 Dako, которое реагирует с С-концами (aa#243-441) Тау. Данные представлены на фиг. 4A-C.

Вестерн-блоты показали иммунореактивные полосы IPN001 (фиг. 4a) и Тау H-150 (фиг. 4b), присутствующие в аффинно-очищенном белке IPN002 как из здоровых, так и AD CSF, которые находились в диапазоне молекулярной массы от ~25 до 37 кДа. Указанные фрагменты Тау были сходны по размерам, но не в отношении своей относительной распространенности, с фрагментами eТау, выделенными из кондиционированных сред линии Дауна. Антитело к С-концу tau Dako (фиг. 4c) не обнаруживало какой-либо вид из аффинного выделения IPN002 или из CSF, или из кондиционированных сред. Полноразмерный Тау не обнаруживался с помощью каких-либо антител Тау из аффинного выделения IPN002. Поскольку аффинно-выделенные белки IPN002 были реактивными по отношению к IPN001 и IPN002 на вестерн-блоте, сделали вывод, что Тау в CSF является также реактивным в отношении IPN001.

Фильтрат CSF и кондиционированных сред из аффинных к IPN002 смол затем наносили последовательно на и элюировали из T46 (Tau#428-441) и HT7 (Tau#159-163) для определения того, присутствовали ли какие-либо С-концевые или центральные фрагменты tau, которые не были выделены с помощью IPN002. Элюаты зондировали с помощью С-концевого антитела Dako (фиг. 4c), но не обнаружили никакой иммунореактивности. Эти данные указывают на то, что иммунореактивный в отношении IPN001 и IPN002 tau более распространен, чем полномерные, являющиеся исключительно центральными или С-концевыми фрагментами tau.

Аликвоты фильтрата от каждой из CSF и кондиционированных сред сохраняли для сравнения до/после выделения для определения того, весь ли обнаруживаемый tau был удален во время выделения, с применением коммерчески доступного набора, обычно используемого для определения содержаний Тау в CSF. Данные показаны на фиг. 5. Указанный анализ продемонстрировал, что весь обнаруживаемый tau был удален из образцов CSF после выделения в ходе процесса аффинного выделения.

Указанные данные предоставляют очевидное доказательство того, что как IPN001, так и IPN002 реагируют с основными видами tau, присутствующими в CSF как от здоровых людей, так и пациентов с AD.

Пример 4. Обнаружение eТау в образцах от пациентов.

Материалы и способы.

Сбор кондиционированных сред от происходящих из iPSC кортикальных нейронов iPSC (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки) получали от здоровых совпадающих по возрасту контрольных пациентов и пациентов с болезнью Альцгеймера с применением способа Yamanaka (Takahashi et al. (2007) Cell 131(5), 861), как описано в Dimos et al. (2008) Science 321:1218. iPSC подвергали дифференциации до кортикальных нейронов в основном согласно опубликованным протоколам с применением способа двойного монослоя SMAD (Chambers et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:275) с последующей дифференциацией кортикальных нейронов, аналогичной той, которая описана в Shi et al. (2012) Nat. Neurosci. 15:477). Происходящие из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN), культивированные в течение 108 дней, отмывали, добавляли свежие среды и кондиционированные среды собирали через три дня, если не указано иное. Проводили многочисленные дифференциации из линий для подтверждения воспроизводимости содержаний eТау. Кондиционированные среды центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин перед обработкой для вестерн-блоттинга или tau ELISA. Для эксперимента с брефелдином А культуры iPSC-CN отмывали PBS перед добавлением свежей среды с 1 мкМ брефелдина А и без него и среды кондиционировали в течение 1 ч перед сбором.

Сбор кондиционированных сред от первичных кортикальных нейронов человека.

Культуры кортикальных нейронов человека (HCC) получали, как описано в Wright et al. (2007) Neurobiol. Aging 28:226. Кратко, эмбриональную ткань коры головного мозга человека получали от Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) и выполняли условия государственных нормативов для эмбрионального исследования и Uniformed Anatomical Gift Act. Ткань промывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro) и растирали в порошок в присутствии 1 мкг/мл ДНКазы (EMD) и пропускали через 100 мкм клеточный фильтр. После центрифугирования осадок ресуспендировали в 0,05% смеси трипсина/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали путем добавления равного объема среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец аккуратно растирали

в порошок снова в присутствии ДНКазы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в средах для планшетов (Neurobasal, содержащие B27, Invitrogen) и количественно оценивали. Клетки помещали на планшеты или на покровные стекла, покрытые поли-d-лизин с ламинином. Отмывали трехнедельные НСС, добавляли свежие среды и среды собирали через три дня кондиционирования. Кондиционированные среды центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин перед обработкой для вестерн-блоттинга.

Сбор ISF мыши P301L и CSF человека.

Мышей подвергали действию анестезии с применением изофурана (2%, 800 мл/мин O₂). Бупивакаин/эпинефрин использовали для местной анестезии и финадин или карпрофен для пери-/послеоперационного обезбоживания. Животных помещали в стереотаксическую рамку (Kopf instruments, USA). Зонды для двухтактного микродиализа (фосфатидилэтаноламинная (PEE) мембрана, Brainlink, Netherlands) вводили в гиппокамп (поверхность воздействия 3 мм). Сбор образцов микродиализа проводили через 24 и 48 ч после операции. В дни забора образцов зонда животных соединяли с помощью трубок из фторированного этиленпропилена (FEP) с микроперфузионным насосом (Harvard PHD 2000 шприцевой насос, Holliston, MA или аналогичным). Зонды для микродиализа подвергали перфузии с искусственной CSF (aCSF), содержащей 147 mM NaCl, 3,0 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂ и 1,2 mM MgCl₂, и 0,15% бычьего сывороточного альбумина (BSA) с объемной скоростью потока, составляющей 0,75 мкл/мин. Образцы микродиализа собирали в течение 60-минутных периодов. После периода стабилизации собирали фоновые образцы. На второй день сбора образцов вышеописанную процедуру повторяли (Brains Online). Интерстициальную жидкость (ISF) центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин и очищали супернатанты, используемые для вестерн-блотов eTau.

Собирали 10 мл CSF (Precision Med) из пула от 10 здоровых (Precision Med), 10 пациентов с AD (Precision Med) и 10 пациентов PSP, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин, супернатанты предварительно очищали на аффинной в отношении IgG смоле с последующим выделением tau на аффинной в отношении антитела к tau IPN002 смоле, отмывали, элюировали с помощью 50 mM глицина, pH 2,3 с 150 mM NaCl в пробирке, содержащей 1 M TBS, pH 8,3 для нейтрализации pH, концентрировали на фильтрах YM10 и получали для tau вестерн-блотов. Кондиционированная среда iPSC-CN от пациента fAD PSEN1 была сходной с выделенной в качестве положительного контроля для сравнения паттернов полос.

Вестерн-блоты.

Кондиционированные среды разбавляли в буфере Лэмли (Sigma). Культивированные нейроны промывали с помощью PBS перед инкубацией в 0,05% трипсине в DMEM (Invitrogen), промывали и лизировали в буфере Лэмли. Все образцы кипятили, разделяли на трис-глицинполиакриламидных гелях (Invitrogen) и переносили на нитроцеллюлозу с применением iBlot (Invitrogen). Мембраны инкубировали в блокирующем буфере (LiCor), подвергали воздействию зондов с помощью 0,5 мкг/мл антитела IPN001 к tau и антитела к β-актину (1:2000; Abcam) в блокирующем буфере, содержащем 0,1% Tween-20 и анти-мышиные 680 и антикроличьи 800 вторичные антитела (LiCor). Блоты сканировали с помощью инфракрасной системы визуализации Odyssey SA и анализировали с применением программного обеспечения Odyssey SA (LiCor).

ELISA в отношении Тау.

Среды собирали через трехдневный период кондиционирования из культур, происходящих из iPSC кортикальных нейронов, и анализировали с применением гомогенного анализа Alphascreen для измерения tau. 10 мкг/мл акцепторных гранул анти-tau AlphaLISA и 1 нМ биотинилированного антитела к Тау смешивали с кондиционированными средами в течение ночи при комнатной температуре. 40 мкг/мл стрептавидиновых донорных гранул (Perkin Elmer) добавляли в течение 30 мин при комнатной температуре и планшет считывали на планшет-ридере Envision.

Очищение eTau.

Кондиционированные среды, собранные из iPSC-CN от пациентов с AD, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин, супернатанты собирали и предварительно очищали на аффинной в отношении IgG смоле. Предварительно очищенный супернатант пропускали через аффинную в отношении антитела к Тау IPN002 смолу, отмывали и элюировали eTau с помощью 50 mM цитрата натрия, pH 2,3 с 150 mM NaCl в пробирке, содержащей 1 M TBS, pH 8,3 для нейтрализации pH. Элюат концентрировали и буфер заменяли на PBS.

Иммунофлуоресценция.

МСС промывали с помощью PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде, блокировали с помощью 10% нормальной сыворотки ослы (Jackson ImmunoResearch) в PBS, пермеабилizировали (если не указано иное) с помощью 0,2% Triton-x-100 в PBS в течение 15 мин и окрашивали с применением антитела к tau IPN001 с антимышиним вторичным антителом A488 ослы (Molecular Probes) и DAPI (Invitrogen). Изображения получали с применением микроскопа Leica DMI 600 B при увеличении в 40 раз с применением программного обеспечения LAS AF (Leica). Конфокальные изображения получали с применением конфокального микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon).

Результаты.

Анализы проводили для обнаружения фрагментов eTau в различных жидкостях. Результаты представлены на фиг. 7. Как показано на левой панели фиг. 7, эндогенный tau секретируется из кортикальных нейронов, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (iPSC-кортикальных нейронов человека; iPSC-CN), причем секретируемый Tau называется внеклеточным Tau или "eTau." Как показано на фиг. 7, вторая панель слева, eTau также присутствует в кондиционированных средах от первичных нейронов человека (кортикальные клетки человека; "HCC"), подтверждая то, что eTau не является артефактом дифференциации iPSC. Указанные фрагменты eTau также обнаруживали в нейрональных лизатах, что указывает на то, что tau расщепляется внутри нейронов перед секрецией eTau.

Как показано на фиг. 7, средняя панель, аналогичные фрагменты tau обнаруживали в интерстициальной жидкости (ISF) от мышей P301L tau, где полноразмерный tau не обнаруживали в какой-либо системе. Мыши P301L являются трансгенными в отношении формы tau человека, характеризующейся мутацией P301L; мыши P301L представляют собой модели для таупатии человек; смотрите, например, Götz et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:529 и Lewis et al. (2000) *Nature Genetics* 25:402.

Как показано на фиг. 7, правые панели, содержание eTau увеличивается в CSF от пациентов с AD, и в многочисленных линиях от пациентов с семейной AD (fAD) по сравнению с линиями от здоровых пациентов. Как показано на фиг. 7, правые панели, eTau также обнаруживали в CSF от пациентов с PSP.

Пример 5. eTau индуцирует нейрональную гиперактивность.

Способы.

Точечную фиксацию потенциала на целой клетке от iPSC-CN, культивированных на монослой нормальных астроцитов человека, выполняли с применением микропипетки (2-5 MOhm), заполненной раствором, содержащим (mM): K-метил-сульфат (140), NaCl (10), CaCl₂ (1), Mg-ATP (3); Na-GTP (0,4), EGTA (0,2), HEPES (10), фосфокреатин (10) с доведенным pH 7,3 и mOsm = 305. Нейроны подвергали перфузии (2 мл/мин) с искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (mM): NaCl (140), KCl (2,5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), Hepes (10), D-глюкозу (10), сахарозу (20), доведенный pH 7,4, mOsm = 310. Регистрацию данных проводили с применением программного обеспечения для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Струйное нанесение eTau или eTau с ингибиторами, тетродотоксином (TTX) (Tocris), MK801 (Sigma), NBQX (Tocris) или антителом к Tau, IPN001, проводили с применением микроперфузионной системы MiniSquirt (AutoMate, Berkeley, CA). Для анализа данных в режиме офлайн использовали программное обеспечение для анализа Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Регистрацию данных проводили при 34-37°C.

Результаты.

Для определения того, может ли eTau изменять нейрональную функцию, очищенный фрагмент eTau наносили на iPSC-CN или HCC. Результаты показаны на фиг. 8A-C.

Как показано на фиг. 8A, добавление смеси очищенных фрагментов eTau на указанные нейроны стимулировало гиперактивность. Как показано на фиг. 8B, гиперактивность, индуцированная смесью eTau, ингибировали с помощью тетродотоксина (TTX) и с помощью NMDA и антагонистов рецептора AMPA глутамата, MK801 и NBQX соответственно. TTX блокирует потенциалы действия в нервах путем связывания с потенциалзависимыми, быстрыми натриевыми каналами в мембранах нервных клеток. Эти данные указывают на то, что индуцированная eTau нейрональная гиперактивность зависит от опосредованного потенциалом действия высвобождения глутамата. Напротив, как показано на средней панели фиг. 8A, нанесение полноразмерного tau не приводило к обнаруживаемым изменениям нейрональной активности даже при значительно повышенных концентрациях, показывая, что индуцированная eTau гиперактивность зависит от фрагментов tau. Эти результаты в отношении индуцированной eTau гиперактивности ясно указывают на то, что в нейронах мобилизация кальция могла происходить. Для определения того, происходит ли мобилизация кальция в нейронах, исследовали эффект eTau на мобилизацию кальция. Как показано на фиг. 8C, eTau-1a сильно мобилизовал кальций. Этот тип нейрональной гиперактивности, если он является продолжительным при таком хроническом состоянии, как AD, мог приводить к нейрональной дисфункции посредством изменения синаптического импульса и aberrантной нейрональной стимуляции. eTau-1a включает в себя аминокислоты 2-166 эмбрионального tau, т.е. аминокислоты 2-166 согласно SEQ ID NO: 27.

Пример 6. Антитело к Tau снижает опосредованную eTau нейрональную гиперактивность.

Электрофизиологические анализы проводили, как описано в примере 5. Оценивали эффект IPN001 и IPN002 на опосредованную e-Tau нейрональную гиперактивность.

Как показано на фиг. 8D, IPN001 снижает опосредованную eTau нейрональную гиперактивность. Как показано на фиг. 19B, IPN002 снижает опосредованную eTau нейрональную гиперактивность.

Пример 7. Гуманизированные антитела к Tau.

Создавали гуманизированные варианты IPN002. Аминокислотные последовательности доменов VH тяжелой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие домен VH тяжелой цепи гуманизированных вариантов, показаны на фиг. 9-12. Аминокислотные последовательности домена VL легкой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие домен VL легкой цепи гуманизированных вариантов, показаны на фиг. 13-16. Амино-

кислотные различия относительно аминокислотной последовательности IPN002 обобщены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Варианты VH

Аминокислотное положение	IPN002 (исходное антитело)	Вариант VH 1	Вариант VH 2	Вариант VH 3	Вариант VH 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
85	L	S	L	L	L
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

Варианты Vk

Аминокислотное положение	IPN002 (исходное антитело)	Вариант Vk 1	Вариант Vk 2	Вариант Vk 3	Вариант Vk 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

Однобуквенные коды аминокислот являются следующими:

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. Определение характеристик гуманизированных вариантов IPN002.

Относительные аффинности связывания tau для связывания с каждым из рекомбинантного tau (383 аминокислотный рекомбинантный tau), а также с eTau1a, eTau1b, eTau2, eTau3 и eTau4 для каждого из 16 комбинаций антител VH#1-4 с Vk#1-4 показаны в табл. 4, которая представлена на фиг. 17. Относительные аффинности связывания для каждого вида tau и eTau в диапазоне от 121 до 1030 пМ для каждой из комбинации антител VH/Vk. eTau 1a включает в себя аминокислоты 2-166 эмбрионального tau, т.е. аминокислоты 2-166 согласно SEQ ID NO: 27; и eTau 1b включает в себя аминокислоты 2-196 и 217-228 эмбрионального tau, т.е. аминокислоты 2-196 и 217-228 согласно SEQ ID NO: 27. Аминокислотные последовательности eTau 3 и eTau 4 представлены на фиг. 20.

Для получения абсолютных аффинностей, а также K_{on} и K_{dis} для указанных антител VH/Vk человека, анализ Octet проводили с применением tau (383 аминокислотный рекомбинантный tau). K_D находились в диапазоне от 42,6 до 2120 пМ. Для всех вариантов VH/Vk значения K_{on} были высокими, и значения K_{dis} были низкими для Tau и для каждого вида eTau. Данные представлены в табл. 5, которая пред-

ставлена на фиг. 18.

Подгруппу вышеописанных гуманизированных вариантов IPN002 исследовали в дополнительном анализе. Как показано на фиг. 19А, три варианта, VH2/Vk1, VH2/Vk2 и VH2/Vk3, использовали в вестерн-блоттинге с разнообразными образцами, содержащими tau. Содержащие tau образцы включали в себя кондиционированные среды iPSC-CN; лизаты iPSC-CN; лизаты головного мозга пациентов с AD; и лизаты коры головного мозга мышей P301L tau; и лизаты головного мозга яванского макака. Данные показывают, что вышеописанные гуманизированные варианты IPN002 являются реактивными в отношении tau в разнообразных образцах.

Подгруппу вышеописанных гуманизированных вариантов IPN002 исследовали в отношении способности снижать индуцированную eTau нейрональную гиперактивность. Как показано на фиг. 19В, исходный IPN002 и варианты VH2/Vk1, VH2/Vk2 и VH2/Vk3 блокировали индуцированную eTau гиперактивность.

Пример 9. Исследование иммуногенности гуманизированных вариантов IPN002.

Гуманизированное антитело к Тау оценивали в отношении иммуногенного потенциала. Использовали анализ EpiScreen™; смотрите, например, Jones et al. (2004) J. Interferon Cytokine Res. 24:560 и Jones et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3:991. Анализы временной зависимости на Т-клетках в проводили с применением истощенных по CD8⁺ мононуклеаров периферической крови (PBMC) и пролиферацию Т-клеток измеряли путем встраивания [³H]-тимидина в различные моменты времени после добавления исследуемых образцов антител.

PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых доноров из сообщества доноров (например, из крови, забранной в течение 24 ч исследования). Т-клеточные ответы на исследуемое антитело (например, гуманизированный вариант IPN002) сравнивали с клиническим стандартным антителом.

Очищенное исследуемое антитело (гуманизированный вариант IPN002) добавляли к культурам PBMC *in vitro* до конечной концентрации, составляющей 50 мкг/мл в культуральной среде, для получения исследуемого образца. Контроль - клиническое антитело (положительный контроль) и содержащий только культуральную среду контроль (нестимулированный контроль) были включены в качестве контрольных образцов. Исследуемые образцы (PBMC вместе с исследуемым антителом) и контрольные образцы инкубировали в течение 8 дней при 37°C с 5% CO₂. На 5, 6, 7 и 7 дни клетки в исследуемых и контрольных образцах суспендировали и переносили в лунки многолуночного культурального планшета. Исследуемые и контрольные образцы подвергали импульсному воздействию 0,75 мКю [³H]-тимидина и инкубировали в течение дополнительных 18 ч перед сбором на плоские фильтры. Число импульсов в 1 мин (срм) для каждой лунки определяли с применением сцинтилляционного измерения.

Для анализов пролиферации использовали пороговое значение SI, равное или больше чем 2, причем образцы, показывающие пролиферативный ответ выше указанного порогового значения, рассматривались как положительные. SI (индекс стимуляции) представляет собой среднее число импульсов для исследуемого образца, разделенное на среднее значение нестимулированного контроля.

Данные показаны на фиг. 21А-С. Пролиферация Т-клеток здоровых доноров отвечает на гуманизированное исследуемое антитело IPN002. Отбирали образцы PBMC из смешанных культур для оценки пролиферации на 5, 6, 7 и 8 день после инкубации с исследуемыми образцами. Пролиферативные ответы с SI ≥ 2,0 (p < 0,05), показанные пунктирной горизонтальной линией, которые были значимыми (p < 0,05) с применением неспаренного критерия Стьюдента для двух образцов, рассматривали как положительные.

Как показано на фиг. 21А, исследуемое полностью гуманизированное антитело IPN002 характеризовалось низким иммуногенным потенциалом (ниже порогового значения SI, составляющего 2,0). На фиг. 21В показаны результаты с эталонным химерным антителом, где эталонное химерное антитело содержит переменные области тяжелой и легкой цепи IPN002 мыши и константную область IgG4 человека; и на фиг. 21С показаны результаты с иммуногенным клиническим контрольным гуманизированным антителом A33.

Пример 10. IPN002 снижает содержание фосфорилированного Тау *in vivo*.

Оценивали эффект введения IPN002 на содержание Тау, который является фосфорилированным на аминокислотах 202 и 205.

Использовали мышиную модель P301L. Мыши P301L являются трансгенными в отношении формы tau человека, характеризующейся мутацией P301L; мыши P301L представляют собой модели для таупатии человека; смотрите, например, Götz et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:529.

Мышей P301L (возрастом 3-4 месяца) подвергали воздействию с помощью следующего: 1) контрольное IgG; 2) антитело к фосфорилированному Тау PHF1 или 3) IPN002. Контрольные антитела IgG и антитела IPN002 вводили с помощью инъекции интраперитонеально в концентрации, составляющей 10 мг/кг в течение 4 недель; затем в концентрации, составляющей 20 мг/кг в течение дополнительных 4 недель. PHF1 вводили в дозе, составляющей 10 мг/кг в течение всего 8-недельного курса. На 60 день после начала схемы лечения антителом содержание фосфорилированного Тау измеряли в гиппокампе. Данные представлены на фиг. 22.

Тау, который является фосфорилированным на аминокислотах 202 и 205, называется "AT8." Как

показано на фиг. 22, лечение с помощью IPN002 дало в результате статистически значимое уменьшение нерастворимого фосфо-Тау (AT8), что оценивали с помощью ELISA (левая панель), и тенденцию в направлении снижения, что оценивали с помощью вестерн-блоттинга (правая панель) по сравнению с лечением контролем - IgG. Лечение с помощью PHF1 показало тенденцию в сторону снижения нерастворимого AT8, что подтверждает данные в Chai et al. ((2011) J. Biol. Chem. 286:34457) и Boutajangout et al. ((2011) J. Neurochem. 118:658).

Пример 11. IPN002 снижает содержание свободного tau как в ISF, так и в CSF.

Определяли эффект введения IPN002 на содержание свободного tau в CSF и интерстициальной жидкости (ISF). Мышей P301L подвергали воздействию, как описано в примере 10. Содержание свободного tau, присутствующего в ISF, который не связан с IPN002, определяли с применением IPN001. Как показано на фиг. 23, лечение с помощью IPN002 снижало содержание свободного Тау (не связанного с IPN002) (левая панель) в ISF у мышей P301L, которых лечили с помощью IPN002.

Для определения того, снижает ли IPN002 содержание свободного Тау в CSF в той же степени, что и он делает в ISF, мышей P301L подвергали воздействию, как описано в примере 10, и определяли эффект лечения с помощью IPN002 на содержание свободного tau (не связанного с IPN002) в CSF подвергнутых воздействию мышей. Результаты показаны на фиг. 24.

На левой панели фиг. 24 показаны содержание свободного tau (не связанного с IPN002; имеющего название "свободный tau (IPN002)") в CSF не получивших лечение, получивших лечение с помощью контрольного IgG, получивших лечение с помощью PHF1 и получивших лечение с помощью IPN002 мышей. Как показано на правой панели фиг. 24, содержание свободного tau в CSF сопоставимы с содержаниями свободного tau в ISF получивших лечение с помощью IPN002 мышей, показывая, что анализ tau в ISF хорошо коррелирует с более клинически релевантным материалом, CSF.

Пример 12. Антитело к Тау снижает опосредованную eTau нейрональную гиперактивность.

Электрофизиологические анализы проводили, как описано в примере 5. Оценивали эффект IPN002 на индуцированную e-Тау нейрональную гиперактивность.

Как показано на фиг. 25, IPN002 снижает опосредованную eTau нейрональную гиперактивность.

Пример 13. Фрагменты Тау присутствуют в CSF, полученной от индивидуумов с вероятной хронической травматической энцефалопатией (СТЕ).

Образцы CSF получали от бывшего судьи на линии Национальной футбольной лиги, который проявлял поведенческие/когнитивные нарушения и который, как считали, вероятно характеризуется наличием СТЕ. Образцы CSF анализировали в отношении присутствия фрагментов eТау. Фрагменты eТау аффинно выделяли из объединенных образцов CSF от здоровых индивидуумов и индивидуумов с вероятной СТЕ. Выделенные фрагменты eТау разделяли с применением электрофореза в полиакриламидном геле; и разделенные фрагменты переносили на мембрану. Мембрану зондировали с помощью IPN001. Результаты, представленные на фиг. 26, показывают, что фрагменты Тау присутствуют в CSF, полученной от индивидуумов с вероятной СТЕ.

Пример 14. Связывание гуманизованного варианта IPN002 с синтетическими пептидами Тау.

Связывание гуманизованного варианта IPN002 ("hu-IPN002") с синтетическим биотинилированным пептидом Тау 1 и 2 исследовали как в анализе в твердой фазе, так и в анализе в жидкой фазе.

Аминокислотные последовательности пептида 1 и пептида 2 являются следующими:

пептид 1 (аминокислоты Тау 13-24): DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO:49);

пептид 2 (аминокислоты Тау 15-44): AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK (SEQ ID NO:50).

Антитело или биотинилированный пептид разбавляли в фосфатно-солевом буферном растворе. Конечные концентрации являлись следующими: 1 мкг/мл hu-IPN002; 1 мкг/мл rTau383 (полноразмерный рекомбинантный Тау); 5 мкг/мл (биотинилированный пептид 1) и 5 мкг/мл (биотинилированный пептид 2). 100 мкл 0,1% казеина в PBS добавляли к лункам многолучного планшета. Добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Проводили серийные разведения. 100 мкл биотинилированных пептидов добавляли к лункам, содержащим серийно разведенное антитело. Многолучный планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз раствором 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS.

Конъюгированное с стрептавидином-пероксидазой хрена (HRP) вторичное антитело добавляли к лункам и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз с помощью раствора 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 1н. серной кислоты. Регистрировали поглощение при 450 нм.

Результаты показаны на фиг. 27 и 28 и обобщены в табл. 6.

Таблица 6

	Hu-IPN002 kD [M] w/ биотин- гTau383	Hu-IPN002 kD [M] w/ биотин- пептид 1	Hu-IPN002 kD [M] w/ биотин- пептид 2
твердая фаза	1,071E-10	1,062E-10	2,777E-10
жидкая фаза	1,135E-10	1,364E-10	3.698E-10

На фиг. 29 изображено связывание hu-IPN002 с полноразмерным рекомбинантным Tau (гTau-383) и пептидом активирующего фосфатазу домена (PAD) (аминокислоты tau 2-28; AEPRQEFVMEHDAGTY; SEQ ID NO:80). Как показано на фиг. 29, hu-IPN002 не связывается с пептидом PAD.

На фиг. 30 показано, что небиотинилированный пептид Tau 1 (аминокислоты Tau 13-24) и небиотинилированный пептид 2 (аминокислоты Tau 15-44) конкурируют с биотинилированными формами пептидом Tau 1 и пептидом Tau 2 за связывание с hu-IPN002. Эти данные показывают, что связывание пептида Tau 1 и пептида Tau 2 с hu-IPN002 является специфическим и не обусловлено добавлением биотина.

Пример 15. In vivo эффект IPN002 на патологию.

В настоящем исследовании исследовали эффект терапевтического вмешательства на снижение подвижности и Tau патологию в трансгенной мышиной модели таупатии (hTau.P301L-Tg). У этих мышей клинический мутант Tau человека (P301L) экспрессируется под контролем мышиного промотора Thy1 (нейрон-специфическая экспрессия). Поведение (хождение по стержню) измеряли в возрасте 7, 8, 8,5 и 9 месяцев, а также за день до вывода из эксперимента. Конечные результаты исследования включали в себя: (1) выживаемость; (2) поведение: эффективность хождения по стержню и показатель поджимания конечностей в баллах; (3) биохимию: общий Tau в общем гомогенате, растворимые и нерастворимые фракции ствола головного мозга; и (4) биомаркеры: AT8 в общем гомогенате и нерастворимых фракциях ствола головного мозга.

Материалы и способы.

Мыши P301L (возрастом 3-4 месяца) получали следующее лечение: 1) контрольный IgG; 2) антитело к фосфорилированному Tau PHF1 или 3) IPN002. Контрольные антитела IgG и антитела IPN002 вводили с помощью инъекции интраперитонеально в концентрации, составляющей 20 мг/кг один раз в неделю в течение 6 месяцев. PHF1 вводили в дозе 10 мг/кг в течение 6 месяцев. PHF1 представляет собой мышиное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп, который включает в себя фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴; Santacruz et al. (2005) Science 309:476.

Массы тела и поведение поджимания конечностей.

Массы тела определяли каждую неделю в течение лечения и при умерщвлении. Массы тела и показатель поджимания конечностей в баллах регистрировали каждую неделю с начала исследования до возраста 7 месяцев. Начиная с возраста 7 месяцев, мышей подвергали мониторингу дважды в неделю в отношении подвижности в домашней клетке, потери массы тела и первых признаков поджимания конечностей задними и передними конечностями. Как только отмечали признаки поджимания конечностей, ежедневно определяли массу тела и поведение поджимания конечностей оценивали в баллах до момента "преждевременного умерщвления". Для оценки поведения поджимания конечностей в баллах мышей удерживали приблизительно на 1,5 см выше основания их хвоста в течение приблизительно десяти секунд. Поджимание конечностей оценивали для каждой конечности отдельно с применением 4-балльной шкалы оценки. Предварительно умерщвленных мышей описывали как обладающих максимальным баллом. Баллы для передних конечностей главным образом использовали как подтверждающее доказательство для решений в отношении умерщвления. Последнее проводили на основании комбинированных наблюдений признаков поджимания конечностей, потери массы тела и подвижности в домашней клетке и согласно заданным критериям. Баллы для левых и правых задних конечностей, унифицированные в один показатель поджимания конечностей в баллах, использовали для оценки развития поджимания конечностей в ходе лечения и оценки различий в группах по окончании исследования. Мышей, которые преждевременно умирали от эпилепсии, исключали из анализа. Статистический анализ проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями с последующим апостериорным анализом Бонферрони и с применением t-критерия Стьюдента на средних значениях в группе последних показателей поджимания конечностей в баллах до умерщвления соответственно.

Хождение по стержню.

Испытание хождения по стержню проводили в фоновой группе и в возрасте 7, 8, 8,5 и 9 месяцев, а также за день до окончания исследования, в группах лечения, для определения двигательной дисфункции и усвоения двигательных навыков. Способность данной мыши удерживать равновесие на стержне и время, которое необходимо, чтобы пройти по стержню расстояние, равное 1 м, представляют собой показатель ее равновесия, координации, физического состояния и двигательной организации. Медный стержень диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Область старта освещали и внутреннюю платформу для выхода помещали в конце. Для начальных тренировочных испытаний использовали более широкий стержень для тренировки мышей удерживать равновесие на платформе. После тренировочных испытаний регистрировали время латентного периода мышей для прохождения расстояния, равного 1 м. Кроме того,

путем наблюдений за походкой определяли первые симптомы двигательной дисфункции (соскальзывание лап и волочение живота). Статистический анализ латентного периода в баллах проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями с последующим апостериорным анализом Бонферрони.

Результаты.

Поведение поджимания конечностей и хождение по стержню.

Эффект IPN002 на поведение поджимания конечностей представлен на фиг. 31. Как показано на фиг. 31, лечение с помощью IPN002 снижало показатель поджимания конечностей в баллах по сравнению с контрольным IgG. Эффект IPN002 на двигательную функцию, оцениваемую по хождению по стержню, представлен на фиг. 32. Как показано на фиг. 32, лечение с помощью IPN002 значительно снижало среднее значение латентного периода (и, таким образом, улучшало двигательную функцию) по сравнению с контрольным IgG. Таким образом, лечение с помощью IPN002 значительно снижает двигательное нарушение у трансгенных мышей P301L tau. С применением того же статистического метода результаты лечения с помощью PHF1 не достигали значимости.

Содержание Тау.

Оценивали содержание свободного tau (tau, не связанного с IPN002) в CSF P301L мышей после лечения с помощью контрольного IgG, PHF1 или IPN002. Содержание свободного tau, присутствующего в CSF, который не связан с IPN002, определяли с применением IPN001. Данные показаны на фиг. 33. Как показано на фиг. 33, лечение с помощью IPN002 снижало содержание свободного tau (не связанный с IPN002) на 96% по сравнению с содержаниями у мышей, получивших лечение контрольным IgG.

Пример 16. Эффект IPN002 на индуцированную eTau нейрональную гипервозбудимость.

Материалы и способы.

Точечную фиксацию потенциала на целой клетке проводили на первичных кортикальных культурах человека. Нейроны подвергали перфузии (2 мл/мин) с искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl (140), KCl (2,5), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), Hepes (10), D-глюкозу (10), сахарозу (20), доведенный pH 7,4, mOsm = 310. Регистрацию данных проводили с применением программного обеспечения для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Струйное нанесение: 1) eTau1a (аминокислоты 2-166); 2) фосфорилированного tau или eTau с ингибиторами; 3) контрольного IgG или 4) антител к Тау, PHF1, IPN001 или Dako (поликлональное антитело к C-концевому tau) проводили с применением микроперфузионной системы MiniSquirt (AutoMate, Berkeley, CA). В анализе данных в режиме офлайн использовали программное обеспечение для анализа Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Регистрацию данных проводили при 34-37°C.

Результаты.

Данные показаны на фиг. 34 и 35. Как показано на фиг. 34, IPN002 снижало индуцированную eTau1a нейрональную гиперактивность. Ни контрольное антитело IgG, ни "Dako" (поликлональное C-концевое антитело) не снижали значительно нейрональную гиперактивность. PHF1 не снижает индуцированную eTau1a нейрональную гиперактивность.

Эффект eTau1a на нейрональную гиперактивность сравнивали с эффектом полноразмерного, PHF1-реактивного, фосфорилированного Тау (фосфо-Тау) на нейрональную гиперактивность. Как показано на фиг. 35, средняя панель, полноразмерный, PHF1-реактивный, фосфо-Тау не индуцировали нейрональную гиперактивность в 2 из исследуемых 3 клеток; третья исследуемая клетка показала только небольшую степень нейрональной гиперактивности по сравнению с фоном (верхняя панель). Напротив, eTau1a индуцировал нейрональную гиперактивность во всех 3 исследуемых клетках (нижняя панель). Эти данные изображены графически на фиг. 36.

Пример 17. Эффект IPN002 на содержание Aβ.

Материалы и способы.

Секреция Aβ из происходящих из iPSC кортикальных нейронов.

Происходящие из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN) культивировали *in vitro*. iPSC получали от здоровых индивидуумов; индивидуумов с семейной AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN1); индивидуума с семейной AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN2) и индивидуума со спорадической AD (sAD). Через приблизительно ~55-60 дней в культуре iPSC-CN сортировали на основании экспрессии LI-CAM (CD171) для обогащения зрелыми кортикальными нейронами; отсортированные клетки выращивали в сокультуре с нормальными астроцитами человека в течение 30 дней. После сокультивирования в течение 30 дней iPSC-CN обрабатывали в течение дополнительных 25 дней с помощью различных концентраций ингибитора фермента, расщепляющего бета-сайт белка-предшественника амилоида (BACE), контрольного IgG или IPN002, с заменой среды 2 раза в неделю. Кондиционированную среду собирали и исследовали в анализах ELISA с высокой чувствительностью в отношении амилоида-бета 40 и амилоида-бета 42 человека от Millipore, для обнаружения Aβ₁₋₄₀ ("Aβ40") и Aβ₁₋₄₂ ("Aβ42"). Aβ40 и Aβ42 представляют собой продукты расщепления белка-предшественника амилоида; сенильные бляшки содержат как Aβ42, так и Aβ40.

Секретия Аβ из первичных кортикальных нейронов человека.

Эмбриональную ткань коры головного мозга человека получали от Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) и выполняли условия государственных нормативов для эмбрионального исследования и Uniformed Anatomical Gift Act. Ткань промывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro), растирали в порошок в присутствии 1 мкг/мл ДНКазы (EMD) и пропускали через 100-мкм клеточный фильтр. После центрифугирования осадок ресуспендировали в 0,05% смеси трипсина/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали путем добавления равного объема среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец аккуратно растирали в порошок снова в присутствии ДНКазы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в средах для планшетов (Neurobasal, содержащие B27, Invitrogen) и количественно оценивали. Клетки помещали на планшеты, культивировали в течение 5 недель и добавляли свежие среды, содержащие антитела в заданных концентрациях в течение 10 дней с заменой сред каждые 3-4 дня с помощью кондиционированных сред, собранных через 10 дней обработки. Кондиционированные среды центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин перед обработкой для анализа ELISA в отношении Аβ40 и Аβ42, как описано выше.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 37-39.

Как показано на фиг. 37, обработка iPSC-CN с помощью IPN002 снижала содержание Аβ40 и Аβ42, секретируемые всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижает секрецию Аβ40 или Аβ42.

На фиг. 38 показаны зависимые от дозы эффекты различных антител на количество Аβ40, секретируемого первичными кортикальными нейронами человека. Как показано на фиг. 38, инкубация первичных кортикальных нейронов человека с 10 или 30 мкг/мл IPN001, IPN002 или hu-IPN002 (гуманизированный вариант IPN002) снижала количество секретируемого Аβ40. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не характеризовались каким-либо значительным эффектом на количество секретируемого Аβ40.

На фиг. 39 показаны зависимые от дозы эффекты различных антител на количество Аβ42, секретируемого первичными кортикальными нейронами человека. Как показано на фиг. 39, инкубация первичных кортикальных нейронов человека с 10 или 30 мкг/мл IPN001, IPN002 или hu-IPN002 снижала количество секретируемого Аβ42. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не характеризовались каким-либо значительным эффектом на количество секретируемого Аβ42.

Пример 18. Картирование эпитопов гуманизированного варианта IPN002.

Материалы и способы.

Антитело или биотинилированный пептид разбавляли в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Конечные концентрации являлись следующими: 1 мкг/мл гуманизированного варианта IPN002 (hu-IPN002); 1 мкг/мл гTau383 (полноразмерного рекомбинантного Тау); 5 мкг/мл биотинилированных пептидов. 100 мкл 0,1% казеина в PBS добавляли к лункам многолуночного планшета, добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Проводили серийные разведения hu-IPN002 и покрывали им лунки многолуночного планшета. 100 мкл биотинилированных пептидов или биотинилированного полноразмерного Тау добавляли к лункам, содержащим серийно разведенное антитело. Многолуночный планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз с помощью раствора 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS.

Конъюгированное со стрептавидином-пероксидазой хрена (HRP) вторичное антитело добавляли к лункам и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз с помощью раствора 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 1н. серной кислоты. Регистрировали поглощение при 450 нм.

Результаты.

Данные показаны на фиг. 40. Данные, представленные на фиг. 40, показывают, что все из биотин-Тау 13-24, биотин-Тау 15-24, биотин-Тау 15-44 и биотин-фосфо-Тау 15-24 (с фосфорилированным Туг, соответствующим аминокислоте 18 полноразмерного Тау) и полноразмерного Тау (гTau383) эффективно связывались с hu-IPN002. Таким образом, hu-IPN002 связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау, независимо от статуса фосфорилирования Туг-18.

Пример 19. Связывание антител с тау в CSF.

Оценивали связывание IPN002, PHF1, антитела, специфического в отношении линейного фосфорилированного эпитопа и контрольного антитела с присутствующим в CSF тау.

Проводили анализ связывания для идентификации антител, которые связывают тау, присутствующий в CSF. Анализ схематически изображен на фиг. 41. Контрольный IgG, поликлональное антитело, специфическое в отношении линейного фосфорилированного эпитопа ("поли-Ab-C-концевой тау"), PHF1 или IPN002 наносили на лунки многолуночного планшета. Антитело разбавляли в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Конечные концентрации являлись следующими: 5 мкг/мл IPN002, IgG, PHF1 или поли-Ab-C-концевой тау. 100 мкл 0,1% казеина в PBS добавляли к лункам многолуночного планше-

та. 100 мкл CSF человека добавляли и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. 100 мкл биотин-BT2 + биотин-НТ7 добавляли к лункам. BT2 представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 194-198 tau человека. НТ7 представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 159-163 tau человека. Многолуночный планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз с помощью раствора 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS.

К лункам добавляли конъюгированное со стрептавидином-пероксидазой хрена (HRP) вторичное антитело и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубационного периода лунки отмывали 5 раз с помощью раствора 0,05% Tween 20 в PBS с последующими 2 отмывками с помощью PBS. Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 1н. серной кислоты. Регистрировали поглощение при 450 нм.

Количественные определения в анализе проводили с применением известных количеств полноразмерного фосфо-tau или известных количеств eTau1a (аминокислоты 2-166 Tau). Как показано на фиг. 41, нижняя панель, анализ проводили с применением полноразмерного tau (нижняя левая панель) или eTau1a (нижняя правая панель) в концентрациях, составляющих 0, 0,16, 0,8, 4, 20 и 100 нг/мл. Как показано на фиг. 41, нижняя левая панель, IPN002, поли-Ab-C-концевой tau и PHF1 связывают полноразмерный tau. Как показано на фиг. 41, нижняя правая панель, только IPN002 связывает eTau1a.

Вышеописанный анализ проводили для исследования связывания поли-Ab-C-концевого tau, PHF1 и IPN002 с tau, присутствующим в CSF человека от: 1) контрольных (здоровых) пациентов; 2) пациентов с MCI; 3) пациентов с легкой стадией AD ("легкая"); 4) пациентов со средней стадией AD ("средняя") и пациентов с тяжелой стадией AD. Результаты показаны на фиг. 42. Как показано на фиг. 42, tau, присутствующий в CSF, связывался PN002, но не линейным эпитопом pAb-tau или PHF1. Данные показывают, что: 1) N-концевые фрагменты Tau присутствуют в CSF; 2) полноразмерный tau обнаруживали в CSF и 3) никаких C-концевых фрагментов tau, которые включают в себя эпитопы BT2 и НТ7, не обнаружили в CSF.

Пример 20. In vivo эффекты IPN002.

Результаты получали из шестимесячного исследования эффективности антител к tau на трансгенных мышах P301L tau. Обнаружили, что IPN002 сильно снижает прогрессирование заболевания, примером чего являлось существенно сниженное содержание свободного tau в CSF, сниженное содержание белкового маркера астроглиоза, улучшение tau патологии в многочисленных областях головного мозга и фосфо-tau эпитопов и улучшенные поведенческие/функциональные показатели. IPN002 функционировал также хорошо или лучше, чем антитело к Tau PHF1. В итоге, in vivo подтверждение получили для нового механизма действия секретируемого tau: регуляция содержаний амилоида-бета путем положительной обратной связи. Настоящее исследование ясно различает способность антитела к eTau, IPN002, по сравнению с PHF1, модулировать содержание амилоида-бета.

Материалы и способы.

Исследования на животных.

Использовали трансгенную мышиную модель P301L. Трансгенная мышь P301L характеризуется экспрессией промотора Thy1 мыши (нейрон-специфической экспрессией), управляемой 4R2N tau человека, мутированным на P301L в качестве трансгена. Трансгенная модель P301L проявляет зависимое от возраста гиперфосфорилирование Tau (AT8 и AT100) в спинном мозге, стволе головного мозга, среднем мозге и коре головного мозга. Гиперфосфорилированный tau проявляет конформационные изменения, которые приводят к агрегации tau, и у мышей развиваются нейрофибриллярные клубки с возраста 6 месяцев, однако с высокой вариабельностью в появлении. Одновременно с патологией у указанных мышей прогрессирующе развиваются такие двигательные нарушения, как поджимание конечностей задней конечностью, сниженная подвижность при хождении по стержню и они требуют преждевременного умерщвления в возрастном диапазоне 8-11 месяцев; Terwel et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 280:3963.

100 рандомизированным мышам и/п каждую неделю вводили дозу антитела с возраста 3,5 месяцев в течение 6 месяцев до достижения возраста 9,5 месяцев. Лечение с помощью 20 мг/кг IPN002 сравнивали с отрицательным контрольным антителом, 20 мкг/кг IgG1 и с антителом к Tau, 10 мкг/кг PHF1. PHF1 представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп, который включает в себя фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴; Santacruz et al. (2005) Science 309:476. Живых мышей исследовали в отношении нарушений поджимания конечностей и в отношении результативности хождения по стержню. Мыши, у которых заболевание быстро прогрессировало до последней стадии, преждевременно умерщвляли (до достижения возраста 9,5 месяцев) с применением заданных критериев. Получали сыворотку, CSF, гиппокамп, кору головного мозга, средний мозг и задний мозг; и полушария головного мозга саггитально разрезали для гистопатологического исследования. Содержание антител измеряли в сыворотке и CSF; общий tau и свободный tau (tau, не связанный с IPN002; "свободный от IPN002" tau) измеряли в CSF; проводили биохимические/гистологические анализы на tau человека и мыши и анализировали амилоид-бета, маркеры воспаления и синаптические белковые маркеры мыши и изменения геной

экспрессии в маркерах воспаления, синаптических маркерах и маркерах нейрональной активности. Все анализы проводили слепым способом.

Число мышей, принимавших участие в указанном исследовании, составляло 25-33 мышей на исследуемую группу и 10 для фона. Всем мышам, включенным в настоящее исследование, присвоили случайное число с помощью компьютера и распределили случайным образом для лечения. Группы мышей показаны в табл. 7.

Таблица 7

Группа	N	Линия	Лечение
1	10	hTau.P301L-Tg	Отсутствует (фоновая группа)
2	32	hTau.P301L-Tg	20 мкг/кг mIgG1 в инертном носителе
3	25	hTau.P301L-Tg	10 мкг/кг PHF1 в инертном носителе
4	33	hTau.P301L-Tg	20 мкг/кг IPN002 в инертном носителе

Все эксперименты на животных проводили согласно нормативам по биоэтике, которые полностью согласуются с международно принятыми принципами в отношении содержания и использования лабораторных животных. На табл. 8 представлены параметры лечения.

Таблица 8

Путь введения	интраперитонеально
Объем дозирования, концентрация	10 мл/кг; 1 мг/мл; 10 мкг/кг/день
Частота лечения	один раз в неделю
Длительность лечения	вплоть до 6 месяцев в зависимости от выживаемости
Распределение по группам лечения	рандомизированное

Массы тела определяли каждую неделю в течение лечения и при умерщвлении. Показатели поджигания конечностей в баллах регистрировали каждую неделю, начиная с возраста 7 месяцев. Начиная с возраста 7 месяцев, мышам подвергали мониторингу дважды в неделю в отношении подвижности в клетке, потери массы тела и первых признаков поджигания конечностей задних конечностей.

Поведение поджигания конечностей.

Для оценки в баллах поведения поджигания конечностей мышам удерживали за основание их хвоста в течение 10 с. Поджигание конечностей задней конечности оценивают в баллах с применением 3-балльной шкалы оценки: 0 - задние конечности вытягивались и пальцы на них растопыривались, 1 - одна задняя конечность частично поджата > 50% времени, 2 - обе задних конечности частично поджаты > 50% времени, 3 - обе задних конечности поджаты полностью в течение > 50% времени. Поджигание конечностей передними конечностями оценивают в баллах как 0. Передние конечности, вытянутые вперед и отстоящие от тела - 1. Одна передняя конечность частично поджата > 50% времени - 2. Обе передних конечности частично поджаты > 50% времени - 3. Обе передних конечности полностью поджаты, неподвижны, потеря мышечной массы, мышь "молится". Мышей, демонстрирующих тяжелый фенотип поджигания конечностей, преждевременно умерщвляли.

Хождение по стержню.

Исследование хождения по стержню проводили в возрасте 7, 8, 8,5, 9 и 8,5 месяцев для определения двигательной дисфункции и усвоения двигательного навыка. Способность мыши сохранять равновесие на стержне и время, необходимое для прохождения 1 м, представляет собой показатель ее равновесия, координации, физического состояния и двигательной организации. Медный стержень диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Область старта освещали и внутреннюю платформу для выхода помещали в дальнем конце. После тренировочных испытаний замеряли время латентного периода у мышей. Кроме того, подсчитывали соскальзывание лап и волочение живота.

Фоновую группу умерщвляли до начала исследования. Мышей в группах исследования, которые проявляли тяжелое поджигание конечностей, снижение массы тела и/или которые становились агонирующими, преждевременно умерщвляли (ранее умерщвление). Оставшихся мышам умерщвляли через 6 месяцев лечения (позднее умерщвление).

Таблица 9

Анестезия	Смесь кетамина, ксилазина 2 %, атропина и солевого раствора/изофурана.
Перфузия	Грудную полость делали доступной для перфузии посредством транскардиальной перфузии с помощью ледяного солевого раствора в течение 3 минут через левый желудочек. Правое предсердие отрезали в качестве путей оттока.
Левое полушарие	Разрезали на гиппокамп, кору головного мозга, средний мозг, мозжечок и ствол головного мозга и остальное, замораживали в жидком азоте.
Правое полушарие	После фиксировали в течение ночи в PBS с помощью 4% параформальдегида и хранили в PBS с 0,1% азидом натрия при 4°C.
CSF	Собранные посредством разреза в мышцах шеи между черепом и первым шейным позвонком. Проводили пункцию мостомозжечковой цистерны с помощью иглы 26 калибра и собирали 10-20 мкл CSF, центрифугировали при 10000 x g при 4°C и хранили при -80°C.
Кровь/плазма	Собирали посредством пункции сердца в EDTA-пробирки, центрифугировали при 2000 x g при 4°C в течение 15 минут и хранили при -70°C.
Масса тела	Измеряли при умерщвлении

Свободный PHF1 в плазме измеряли путем добавления соответствующим образом разведенной плазмы к покрытым тау планшетами и обнаруживали с применением ELISA с помощью конъюгированного с HRP антитела к IgG мыши и TMB. Чувствительность анализа свободного PHF1 была недостаточной для измерения содержаний свободного PHF1 в CSF.

Свободный IPN002 в плазме и в CSF измеряли путем добавления соответствующим образом разведенной плазмы или CSF к покрытым тау планшетами и обнаруживали с применением ELISA с помощью конъюгированного с HRP антитела к IgG мыши и TMB.

Общий тау в CSF измеряли с применением сэндвич-ELISA с применением как покрытия с помощью антитела к Тау, так и обнаружения антител к Тау, которые продемонстрировали отсутствие конкуренции или с IPN002, или с PHF1.

Свободный тау (свободный от IPN002) в CSF измеряли с применением гомогенного ELISA с применением двух антител к Тау для захвата тау в CSF. Одно из указанных антител конкурирует с IPN002 и, следовательно, не будет взаимодействовать с тау, который предварительно был связан с IPN002 в CSF.

Гиппокамп и кору головного мозга фракционировали путем гомогенизации в 10 мас.об. смеси холодного TBS/протеазы Roche/коктейля ингибиторов фосфатазы. Гомогенат получали путем центрифугирования детрита при 10000×g в течение 15 мин. Определение содержания белка BCA проводили на гомогенатах; все гомогенаты разбавляли до 1 мг/мл и соответствующие фракции разбавляли эквивалентно. Часть гомогената центрифугировали 1 ч при 100000×g при 4°C для получения растворимой фракции (S1) и нерастворимого осадка. Нерастворимые осадки ресуспендировали в смеси 1% саркозила/протеазы Roche/коктейля ингибиторов фосфатазы и снова центрифугировали в течение 1 ч при 100000×g. Солюбилизированные саркозилом супернатанты метили (P1); нерастворимый в саркозиле осадок ресуспендировали и метили (P2). Задний мозг фракционировали аналогичным образом, за исключением высокой концентрации соли (0,85 M NaCl) с последующим использованием 1% саркозила для солюбилизации осадков P1.

Гомогенный ELISA тау человека специфически отвечает на тау человека, и его использовали для определения содержаний тау человека в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре головного мозга и заднем мозге.

Гомогенный ELISA AT8 человека специфически отвечает на p202/205 тау человека, и его использовали для определения содержаний AT8 человека в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре головного мозга и заднем мозге.

Вестерн-блоттинг SDS-PAGE в отношении HT7, IPN001, поликлонального-тау Dako, AT8, AT100, анти-p262, анти-p396 и AD2, GFAP, Iba1, синапсина проводили на фракциях гиппокампа, коры головного мозга и/или заднего мозга (гомогената, S1, P1 и/или P2). Один или несколько контрольных лизатов исследовали на каждом геле для подтверждения правильного нормирования между гелями. Все проанализированные полосы нормировали относительно β-актина в соответствующем образце гомогената. Антитела и их мишени показаны в табл. 10.

Таблица 10

Антитело	Мишень
IPN001	Тау и eTau
HT7	Тау человека
Поликлональное антитело к тау Dako	Тау человека и мыши
AT8	Тау p202/205 человека и мыши (фосфорилированный на Ser202 и Thr205)
AT100	Тау p212 человека и мыши (фосфорилированный на Ser212)
Анти-p262	Тау p262 человека (фосфорилированный на Ser262)
AD2	Тау p396 человека и мыши (фосфорилированный на Ser396)
p396	Тау p396 человека и мыши (фосфорилированный на Ser396)
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	GFAP мыши на астроцитах
Адапторная молекула связывания ионизированного кальция 1 (Iba1)	Iba1 мыши микроглии
Синапсин	Синапсин мыши (синаптический белок)

Для гистопатологических исследований 6/32 рандомизированных, сагитально разрезанных полушарий головного мозга окрашивали в отношении AT8 и AT100; сигналы выявляли с помощью DAB. Количественно определяли как расположенную рядом с субталамическим ядром неопределенную зону (брегма 2,08-1,12), так и расположенное рядом с латеральным мозжечковым ядром промежуточное ядро мозжечка (переднюю и заднюю часть) (IntA/P/LAT; брегма 2,28-1,32) (слепым методом).

ELISA для определения амилоида-бета мыши (как Aβ40, так и Aβ42) проводили для специфического обнаружения Aβ40 и Aβ42 в гомогенатах головного мозга мышей. ELISA Aβ42 мыши не был достаточно чувствительным для надежного определения содержаний в гомогенатах головного мозга мышей. ELISA Aβ40 мыши хорошо обнаруживал содержание Aβ40 мыши в пределах линейного диапазона ана-

лиза. ELISA A β 40 мыши использовали для определения содержаний A β 40 во всех исследуемых гомогенатах и растворимых (S1) фракциях.

Анализ Taqman проводили на маркерах воспаления, синаптических маркерах и маркерах нейрональной активности. В табл. 11 перечислены указанные маркеры.

Таблица 11

Ген	Функция
APP	Белок-предшественник амилоида: мутированный/каузальный у некоторых пациентов с fAD
Tau человека	Белок МТВ; агрегаты при AD
Arc	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

Статистические показатели.

Лонгитюдный статистический анализ поджимания конечностей и хождения по стержню проводил независимый специалист по статистическому анализу. Кратко, наклон кривой снижения определяли для каждой мыши как для нарушения поджимания конечностей, так и хождения по стержню и указанные коэффициенты использовали для определения, если между группами существовали значимые различия. Многочисленные способы использовали для определения наклона кривых и значимости. Для поджимания конечностей они включали в себя лонгитюдный полный анализ случая, объединенную модель, адаптированную для пропущенных данных, и лонгитюдный анализ с байесовским упорядочиванием. Для хождения по стержню они включали в себя лонгитюдный полный анализ случая, объединенную модель, адаптированную для пропущенных данных, лонгитюдный анализ с применением 30-секундных значений, байесовский лонгитюдный анализ с пропущенными значениями и живой, но не пересекающийся анализ.

Статистический анализ для определения значимости для биохимии, гистологии и генной экспрессии проводили на целой когорте, когортах раннего умерщвления и позднего умерщвления с применением однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным анализом Дуннетта. Определение t-критерия также проводили в отношении прогрессирования заболевания (фоновая группа 3,5-месячных животных по сравнению с группами 9,5-месячных животных, получивших лечение с помощью IgG) в качестве компаратора для значимости, полученной из однофакторного дисперсионного анализа. Если выясняли, что PHF1 или IPN002 в большой степени имеет тенденцию к изменениям, но это не отражается в однофакторном дисперсионном анализе, определение t-критерия, сравнивающего IgG с PHF1 или IPN002, проводили исключительно для определения того, появлялись ли паттерны тенденции для указанного конечного результата без достижения значимости в однофакторном дисперсионном анализе.

Для определения того, какие из 116 конечных результатов наилучшим образом коррелируют друг с другом, проводили матричную корреляцию; и самые высокие корреляторы ранжировали на основании комбинации их r^2 -значений и p-значений.

Результаты.

Содержание антител и воздействие на цель.

Плазму и CSF получали до умерщвления. Определяли содержание свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме и свободного IPN002 в CSF. Анализ свободного PHF1 не был достаточно чувствительным для измерения содержаний свободного PHF1 в CSF. Достаточное количество CSF также получали для определения содержаний как общего Tau, так и свободного Tau (свободного от IPN002).

Содержание свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме.

Трансгенные мыши P301L Tau получали лечение с помощью 20 мкг/кг IgG, 20 мкг/кг IPN002 или 10 мкг/кг PHF1. Указанные дозировки выбирали на основании результатов исследования воздействия на цель № 1. Обобщенные данные показаны в табл. 12.

Таблица 12

Антитело	Исследование воздействия на цель № 1		Исследование эффективности	
	Введенная доза	Среднее содержания свободного антитела (плазма)	Введенная доза	Среднее содержания свободного антитела (плазма)
IPN002	10 мк/кг в течение 4 недель-> 20 мк/кг в течение 4 недель	0,65 мкМ	20 мк/кг в течение 26 недель	0,9 +/- 0,26 мкМ
PHF1	10 мк/кг в течение 8 недель	0,65 мкМ	10 мк/кг в течение 26 недель	0,55 +/- 0,05 мкМ

В исследовании воздействия на цель № 1 обнаружили, что 10 мк/кг IPN002 в течение 4 недель с последующим введением 20 мк/кг IPN002 в течение дополнительных 4 недель давало в результате, в среднем, 0,65 мкМ свободного IPN002 в плазме. Такую же концентрацию, 0,65 мкМ свободного PHF1, получали при постоянном введении 10 мк/кг PHF1 в течение 8 недель. В настоящем исследовании, как показано в табл. 12, средние концентрации в плазме составляли 0,55 мкМ свободного PHF1 и 0,9 мкМ IPN002. Таким образом, среднее содержание свободного IPN002 были выше, чем свободного PHF1 в плазме.

Содержание свободного IPN002 в CSF.

В среднем, 0,9 нМ свободного IPN002 присутствовало в CSF получивших лечение с помощью IPN002 мышей P301L tau, как показано в табл. 13. Это можно выразить как 0,1% свободного IPN002 в CSF:плазме; т.е. концентрация IPN002 в CSF составляла 0,1% от концентрации IPN002 в плазме (0,9 нМ в CSF; 0,9 мкМ в плазме). 0,1% антитела в CSF согласуется с процентными отношениями, определенными для других антител в достижении головного мозга и выделении в CSF после периферического введения. Анализ свободного IPN002, тем не менее, регистрирует только IPN002, который не связан с tau. Тау связывается с IPN002 в CSF; таким образом, значение 0,1% недостаточно представляет общий IPN002 в CSF. Расчеты, в которых содержание свободного IPN002 суммировали с содержанием IPN002, связанным с тау, указывали на то, что содержание общего IPN002 в CSF составляют ~0,2% от содержаний в плазме. Как указано в способах, анализ свободного PHF1 является недостаточно чувствительным для измерения содержаний свободного PHF1 в CSF.

Таблица 13

Антитело	Исследование эффективности	
	Среднее содержание свободного антитела (плазма)	Среднее содержание свободного антитела (CSF)
Свободный IPN002	0,9 +/- 0,26 мкМ	0,9 +/- 0,28 нМ

Общий Тау в CSF.

Содержание общего Тау в CSF измеряли для определения того, изменяли ли PHF1 или IPN002 эти содержания. Как показано на фиг. 43, содержания общего tau в CSF не изменялись в значительной степени под воздействием лечения с помощью PHF1 или IPN002. Этот результат предположили на основании данных, полученных в исследовании воздействия на цель.

Фиг. 43: содержание общего tau в CSF трансгенных мышей P301L tau измеряли с применением анализа сэндвич- ELISA с использованием антител к тау. Как показано на фиг. 43, содержание tau в CSF значительно увеличивались с возрастом (сравните 3 месячный фон с мышинным IgG). Ни PHF1, ни IPN002 не изменяли содержания общего тау.

Свободный Тау (от IPN002) в CSF.

Анализ свободного Тау (от IPN002) в CSF, как описано в способах, представляет собой ELISA, в котором одно из двух антител к тау конкурирует с IPN002; следовательно, анализ не будет обнаруживать тау, который связан с IPN002. Указанный анализ показывает, проник ли IPN002 в головной мозг и CSF и достиг ли своей мишени (т.е. связался с тау). Если IPN002 достиг своей мишени, сигнал в анализе будет пониженным.

Указанный анализ является специфическим в отношении свободного от IPN002 тау и, следовательно, не обнаруживает свободный Тау (свободный от PHF1). Как показано на фиг. 33, содержание свободного Тау (свободного от IPN002) увеличивается с прогрессированием заболевания, что согласуется с данными, представленными выше. PHF1 не воздействует на содержание свободного Тау. Напротив, лечение с помощью IPN002 приводило к 96% снижению сигнала в отношении содержаний свободного Тау (свободного от IPN002). Указанные данные показывают, что IPN002 полностью достиг своей мишени, тау в CSF.

Биохимия и гистология Тау и фосфо-Тау.

Как описано в способах, гиппокамп, кору головного мозга и задний мозг фракционировали в гомогенат, растворимые (солюбилизованные в саркозиле) и нерастворимые (нерастворимые в саркозиле) фракции. Фракции анализировали в отношении тау как человека, так и мыши, и в отношении многочис-

ленных эпитопов фосфо-tau (AT8, AT100, p262, p396 и AD2), которые являются гиперфосфорилированными в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. Как показано на фиг. 44 А-Н, лечение с помощью IPN002 снижало содержание AT8 в гиппокампальном гомогенате (фиг. 44А), гиппокампальной фракции S1 (фиг. 44В), гиппокампальной фракции P1 (фиг. 44С), гиппокампальной фракции P2 (фиг. 44D), кортикальном гомогенате (фиг. 44Е) и кортикальной фракции P1 (фиг. 44G) по сравнению с лечением с помощью контрольного антитела IgG мыши. Данные на фиг. 44А-Н показывают, что лечение с помощью IPN002 снижало содержание AT8 в аналогичной или большей степени, чем лечение PHF1. Данные, представленные на фиг. 44А-Н, нормировали к ВСА.

Как показано на фиг. 45А, лечение с помощью IPN002 снижало содержание p396-tau человека в фракции S1 коры головного мозга по сравнению с лечением с помощью контрольного антитела IgG мыши. Как показано на фиг. 45В и 45С, лечение с помощью IPN002 снижало содержание фосфо-tau S262 в гомогенате коры головного мозга (фиг. 45В) и во фракции коры головного мозга S1 (фиг. 45С) по сравнению с лечением с помощью контрольного антитела IgG мыши. Как показано на фиг. 45D и 45Е, лечение с помощью IPN002 снижало содержание мышинового p396-tau во фракции коры головного мозга S1 (фиг. 45D) и снижало содержание мышинового AT100 во фракции коры головного мозга S1 (фиг. 45Е) по сравнению с лечением с помощью контрольного антитела IgG мыши.

Гистопатологию Tau (AT8 и AT100) анализировали в двух отдельных ядрах в пределах заднего мозга, расположенной рядом с субталамическим ядром неопределенной зоны и расположенным рядом с латеральным мозжечковым ядром в промежуточном ядре мозжечка (передней и задней части) (IntA/P/LAT). Как показано на фиг. 46, IPN002, у поздно умерщвленных мышей значительно улучшали патологию заболевания AT8. PHF1 имело тенденцию снижать, но не значительно улучшать, гистопатологию tau. Как показано на фиг. 47, лечение с помощью IPN002 улучшало патологию заболевания AT100 и MC1 по сравнению с лечением контрольным IgG.

Воспаление.

Как астроглиоз, так и микроглиоз изучали в моделях AD и таупатий. Роль, которую активированные астроциты или микроглия играют в заболевании, тем не менее, не вполне ясна. Если астроциты или микроглия активируют в трансгенной модели P301L tau, такая активация будет являться результатом избыточной экспрессии мутированного tau. Предполагают, что секретируемый tau индуцирует патологию AD. Если секретируемый tau индуцирует патологию AD, то он также может индуцировать глиальную активацию. В связи с этим, определяют, увеличиваются ли белки, которые увеличиваются при астроглиозе (GFAP) или микроглиозе (Iba1) в трансгенной мышинной модели P301L.

Как показано на фиг. 48А и 48В, содержание белка GFAP увеличивается с прогрессированием заболевания как в гиппокампе, так и коре головного мозга. Эти данные указывают на то, что астроциты активируются в гиппокампе и коре головного мозга или что они инфильтрировали указанные области головного мозга. Лечение с помощью IPN002 значительно снижало содержание белка GFAP как в гиппокампе, так и коре головного мозга, показывая, что лечение с помощью IPN002 снижало связанное с заболеванием увеличение астроглиоза. PHF1 значительно снижал GFAP в гиппокампе, но не в коре головного мозга.

Содержание белка Iba1, маркера для микроглии измеряли как в гиппокампе, так и коре головного мозга. Как показано на фиг. 49А и 49В, Iba1 не увеличивается с прогрессированием заболевания в гиппокампе, но увеличивается в коре головного мозга. Лечение с помощью IPN002 не характеризовалось каким-либо эффектом на содержание белка Iba1 с прогрессированием заболевания. Напротив, лечение с помощью PHF1 не значительно снижало содержание белка Iba1. Данные указывают на различные механизмы действия для IPN002 и PHF1.

Модуляция содержания амилоида-бета.

Как показано в примере 17, обработка iPSC-CN с помощью IPN002 снижала содержание A β 40 и A β 42, секретируемых всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижал секрецию A β 40 или A β 42. Затем определяли, модулирует ли IPN002 также содержание A β in vivo. В мышинной модели P301L не наблюдали избыточной экспрессии APP человека; следовательно, измеряли содержание A β мыши. Чувствительность ELISA A β 42 мыши была недостаточной для измерения содержаний A β 42 в указанных гомогенатах. ELISA A β 40 мыши, тем не менее, был достаточно чувствительным и, следовательно, его использовали для определения содержаний A β 40 мыши в гомогенатах и фракциях супернатантов. Содержание A β 40 мыши увеличивается с прогрессированием заболевания. Наблюдаемое увеличение содержаний A β 40 могло быть зависимым от tau и/или зависимым от возраста. Как показано на фиг. 50А и 50В, обработка с помощью IPN002 снижала содержание A β 40 как в гомогенате (фиг. 50А), так и в растворимой фракции (фиг. 50В).

Данные на фиг. 50А и 50В показывают, что избыточная экспрессия tau (возможно, совместно со старением) управляет связанным с прогрессированием заболевания увеличением содержаний A β 40. Данные указывают на то, что секретируемый tau представляет собой причину увеличения содержания A β , которые IPN002, в свою очередь, ингибирует за счет блокирующей функции eTau. PHF1, напротив, не связанное с eTau антитело, не характеризуется каким-либо эффектом на содержание A β .

Двигательная функция.

Определяли эффект лечения с помощью IPN002 на двигательную функцию, которую оценивали в испытаниях поджимания конечностей и хождения по стержню. Данные показаны на фиг. 31, 32, 51 и 52.

Как показано на фиг. 31, лечение с помощью IPN002 улучшало показатели поджимания конечностей в баллах по сравнению с лечением с помощью контрольного IgG мыши.

Как показано на фиг. 32 и 51, лечение с помощью IPN002 улучшало среднее значение латентного периода в испытании хождения по стержню (фиг. 32) и снижало процентное отношение мышей, не способных пройти по стержню (фиг. 51), по сравнению с лечением с помощью контрольного IgG мыши.

Пример 21. Картирование эпитопов.

Анализы связывания пептидов и конкурентные анализы проводили, как описано в примере 18 выше.

Использовали следующие пептиды:

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

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

IPIG-3: AGTYGLGD (SEQ ID NO:82; аминокислоты 15-22 Tau);

IPIG-4: AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK (SEQ ID NO:50;

аминокислоты 15-44 Tau);

пептид PAD: AEPRQEFVEMEDHAGTY (SEQ ID NO:80; аминокислоты 2-18 Tau).

Результаты показаны на фиг. 53-55.

На фиг. 30 показано, что небиотинилированные пептиды tau конкурируют с биотинилированными формами Tau. На верхней панели показана конкуренция биотинилированного пептида Tau 13-24 (IPIG-2; SEQ ID NO: 49) с небиотинилированным Tau 13-24 за связывание с hu-IPN002.

На фиг. 52 показано, что полноразмерный tau, IPIG-1, IPIG-2 и IPIG-4 были связаны с hu-IPN002. IPIG-3, у которого отсутствуют остатки 23 и 24, не был связан hu-IPN002, а также не представляя собой PAD. Таким образом, оказалось, что остатки 23 и 24 необходимы для связывания hu-IPN002.

На фиг. 53 показано, что пептид eTau-4 связывается с hu-IPN002; тем не менее, пептиды PAD (Tau 2-18), Tau 15-22, Tau 19-28 и Tau 21-31 не были связаны с hu-IPN002.

Данные показывают, что остатки 15-24, вероятно, необходимы для связывания с hu-IPN002.

Принимая во внимание то, что настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в настоящей области техники следует понимать, что можно произвести различные изменения и можно заменить эквиваленты, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения. Кроме того, можно произвести многочисленные модификации для адаптации конкретной ситуации, материала, композиции, способа, стадии или стадий способа к цели, сущности и объема настоящего изобретения. Предусмотрено, что все такие модификации находятся в пределах объема формулы изобретения, прилагаемой к настоящему описанию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывает Tau, содержащее:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

с) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

д) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

е) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

ф) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

г) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную по-

следовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

k) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

l) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43;

m) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

n) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

o) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

p) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

2. Антитело по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

3. Антитело по любому из пп.1 и 2, в котором антитело содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

4. Антитело по любому из пп.1 и 2, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи IgG4 человека.

5. Антитело по любому из пп.1 и 2, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи IgG4 человека, где тяжелая цепь содержит шарнирную область, содержащую замену S241P (нумерация согласно Kabat).

6. Антитело по любому из пп.1 и 2, в котором антитело содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи IgG4 человека, и (ii) легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи каппа человека.

7. Антитело по любому из пп.1 и 2, в котором антитело содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи IgG4 человека, где тяжелая цепь содержит шарнирную область, содержащую замену S241P (нумерация согласно Kabat), и (ii) легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи каппа человека.

8. Антитело по любому из пп.1 и 2, причем антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'.

9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, слитое с ПЭГ.

10. Антитело по любому из предшествующих пунктов, слитое, напрямую или посредством линкера, с молекулой-носителем, пептидом или белком, который стимулирует пересечение гематоэнцефалического барьера.

11. Фармацевтическая композиция для лечения таупатии, содержащая:

a) терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп.1-10 и

b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, в которой антитело инкапсулировано в липосоме.

13. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп.1-8, причем нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом транскрипционного контроля, который является активным в эукариотической клетке.

14. Клетка-хозяин, генетически модифицированная рекомбинантным экспрессионным вектором по п.13.

15. Применение антитела по любому из пп.1-10 для лечения таупатии у человека.

16. Применение антитела по п.15, где таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

17. Применение антитела по п.15, где таупатия представляет собой лобно-височную деменцию.
18. Применение антитела по п.15, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.
19. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.11 и 12 для лечения таупатии у человека.
20. Применение фармацевтической композиции по п.19, где таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.
21. Применение фармацевтической композиции по п.19, где таупатия представляет собой лобно-височную деменцию.
22. Применение фармацевтической композиции по п.19, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.
23. Способ мониторинга прогрессирования таупатии у человека, включающий:
- а) определение первого содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от человека в первый момент времени;
 - б) определение второго содержания полипептида Тау в биологическом образце, полученном от человека во второй момент времени; и
 - в) сравнение второго содержания Тау с первым содержанием Тау, причем указанное определение включает:
 - i) приведение в контакт биологического образца с антителом по любому из пп.1-10 и
 - ii) количественное определение связывания антитела с присутствующим в образце полипептидом Тау.
24. Применение антитела по любому из пп.1-10 в способе визуализации для обнаружения полипептида Тау в ткани головного мозга человека.

Последовательности тяжелой цепи IPN001 гибридомы

```

1      E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L
2      GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGAAGAC TTAGTGAAGC CTGGAGGATC COTGAAACTC
61     S C V A S G F A F S S Y G M S W V R Q T
      TCCTGTGTCG CTCTGTGATT CGCTTTCAGT AGCTATGGCA TGTCTTGGGT TGGCCAGACT
121    P D M R L E W V A T I S S S G S R T Y F
      CCAGACATGA GGCTGGAGTG GGTGCGAAC 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 TGAAGGGGCG ACTCACCATC TCCAGAGACA ATGACAAGAA CATCCTATAC
241    L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W
      CTACAAATGA GCAGTGTGAG GTCTGAGGAC ACAGGCATGT 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 GGGTGTGTGA ATATCAGTCA CCGTCTCTC A (SEQ ID NO:18)

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно системе нумерации Kabat. CDR и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDR, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Фиг. 1А

Последовательности легкой цепи IPN001 гибридомы

```

1      D V L M T Q T P L S L A V N L G D Q A S
      GATGTTTTGA 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
      CTCTGTGTCG GATCAGTCA GACTATTTTA CATAGTAATG GAAATACCTA TTTAGAATGG
121    Y L Q K P G Q S P R L L I Y K V S K R F
      TATTTGCAGA AACAGGCCA GTCTCCAAGA CTCTGTATCT ACAAGTTTC TAAACGATTT
181    S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
      TCTGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAAGATC
241    S R V E A D D L G I Y Y C F Q G S L V F
      AGCAGAGTGG AGGCTGACGA TGTGGGAATT TATTACTGCT TTCAAGTTTC ACTTTTCTCT
301    W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:13)
      TGGGCTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:17)

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно системе нумерации Kabat. CDR и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDR, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Фиг. 1В

Последовательности тяжелой цепи IPN002 гибридомы

```

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 CTGGAGGATC COTGAAACTC
61     S C A A S G F S F S K Y G M S W V R Q T
      TCCTGTGTCG CTCTGTGATT CAGTTTCAGT AAATATGGCA TGTCTTGGGT TGGCCAGACT
121    P D K R L E W V A T I S S S G S R T Y Y
      CCAGACAAGA GGCTGGAGTG GGTGCGAAC 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 TGAAGGGGCG ACTCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCGTGAC
241    L Q M S S L R S E D T A M Y Y C S I S W
      CTGCAAAATG GCAGTGTGAA GTCTGAGGAC ACAGGCATGT 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 ACCTCAGTCA CCGTCTCTC A (SEQ ID NO:20)

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно системе нумерации Kabat. CDR и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDR, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Фиг. 2А

Последовательности легкой цепи IPN002 гибридомы

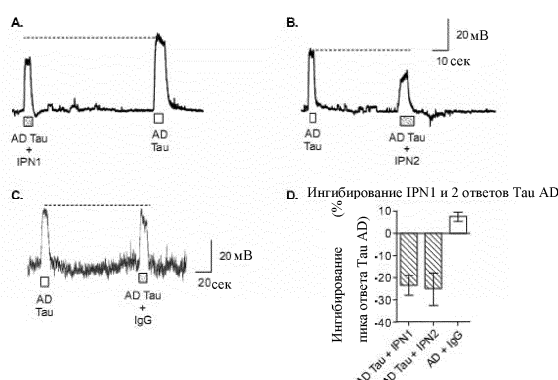
```

      D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S
1  GATGTTTGA TGACCAAAAC TCCACTCTCC CTGCTGTCA GTCTTGAGA TCAAGCCTCC
      I S C K S S Q S I V H S N G N T V L E W
61 ATCTCTTGA AATCTAGTCA GAGCATTGTA CATAGTAATG GAACACCTA TTTAGAAATGG
      Y L Q K P G Q S P R L L V Y K V S N R F
121 TACCTGCAGA AACCAAGGCA GTCTCCAAAG CTCTGGTCT ACAAGTTTC CAATCGATT
      S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
181 TCTGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAAGATC
      S R V E A E D L G T Y Y C F Q G S L V P
241 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TCTGGGAAC TATTACTGCT TCAAGTTTC ACTTGTCTCT
      W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:15)
301 TGGGCTTCS GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:19)

```

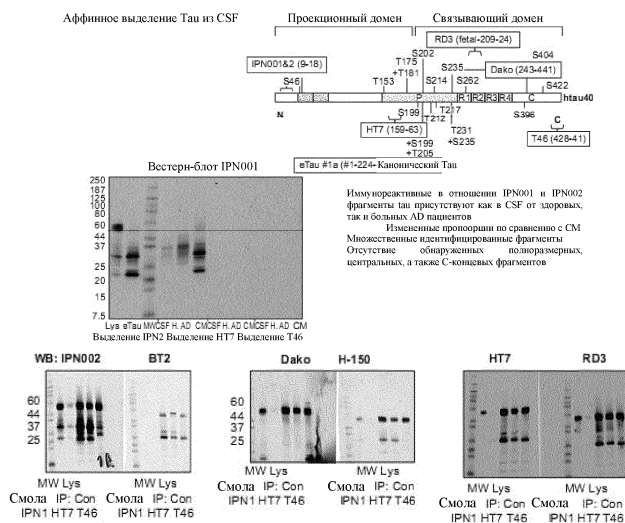
Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно системе нумерации Kabat. CDR и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDR, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Фиг. 2В



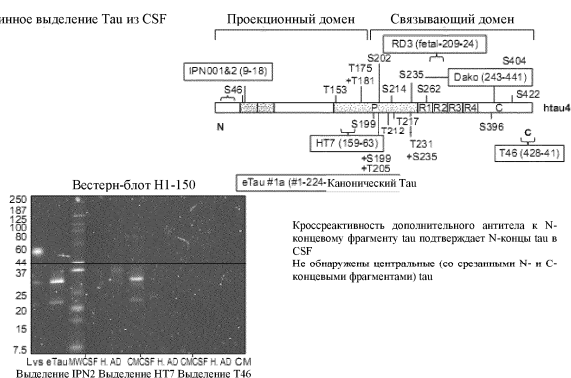
Фиг. 3

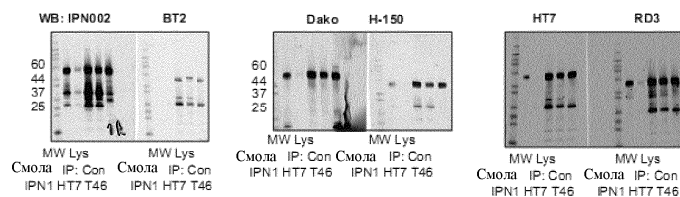
Аффинное выделение Тау из CSF



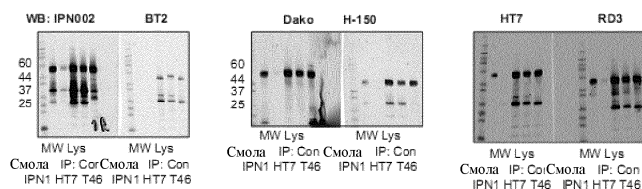
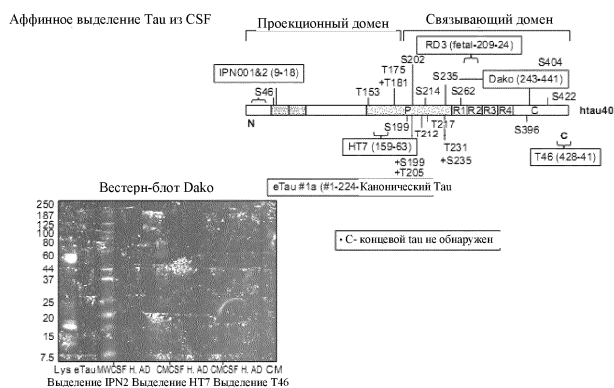
Фиг. 4А

Аффинное выделение Тау из CSF



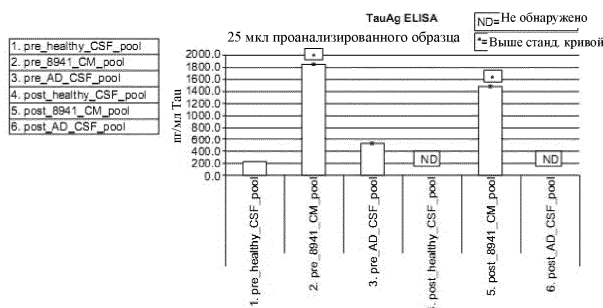


Фиг. 4В



ФИГ. 4С

Количественное определение образцов CSF и CM до и после аффинного выделения Tau



ФИГ. 5

Изоформы Таи человека			
изоформа	2	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	60
изоформа	3	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	60
изоформа	4	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	44
изоформа	5	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	60
изоформа	6	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	60
изоформа	1	MAEPFQSEFVMDHAGTYGLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLKESPIQTPTDESEEPG	60
эмбриональный		MAE-----эмбриональный-----GLGDRQDGGVYTHNQDQSDTDAGLK-----	
изоформа	2	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	120
изоформа	3	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	62
изоформа	4	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	62
изоформа	5	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	90
изоформа	6	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	120
изоформа	1	SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	120
эмбриональный		SETSDAKSTPTAEVTPALIVDEGAPGKQAQAQPHTEIFPGTTAAEAGIGDPTSLDEDAAG	

изоформа	2	HTVTC-----	124
изоформа	3	HTVTC-----	66
изоформа	4	HTVTC-----	66
изоформа	5	HTVTPESGKVVYQGFLEPGRPPGLSHQLMGMGFGAPALPEGPREATPQSGTGPDTEED	180
изоформа	6	HTVTPESGKVVYQGFLEPGRPPGLSHQLMGMGFGAPALPEGPREATPQSGTGPDTEED	180
изоформа	1	HTVTPESGKVVYQGFLEPGRPPGLSHQLMGMGFGAPALPEGPREATPQSGTGPDTEED	180
эмбриональный		HTVTC-----	

ФИГ. 6А

изоформа 2		
изоформа 3		
изоформа 4		
изоформа 5		
изоформа 6		
эмбриональный	GRHAPELLKHQLGLDHLHQEGPPLKGAGGKERPGSKKEVDECDRDVDESSPQDSPPSKASPA 240	
изоформа 2	GRHAPELLKHQLGLDHLHQEGPPLKGAGGKERPGSKKEVDECDRDVDESSPQDSPPSKASPA 240	
изоформа 3		
изоформа 4		
изоформа 5		
изоформа 6	QDGRPPQTAAREATSIPGFFAEGALPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGGSVGRAGQGQDAPLE 300	
эмбриональный	QDGRPPQTAAREATSIPGFFAEGALPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGGSVGRAGQGQDAPLE 300	
изоформа 2		
изоформа 3		
изоформа 4		
изоформа 5		
изоформа 6	FTFHVEITPNVQREQAHSEENLGRAAPFGAPGEQFARAPFGEEDTNEADLPFPESEKQPA 360	
эмбриональный	FTFHVEITPNVQREQAHSEENLGRAATFGAPGEQFARGFELGEDTNEADLPFPESEKQPA 360	
изоформа 1		
эмбриональный	-----ARMVSKSKDGTGSDCKKAK----- 143	
изоформа 2	-----ARMVSKSKDGTGSDCKKAK----- 85	
изоформа 3	-----ARMVSKSKDGTGSDCKKAK----- 85	
изоформа 4	-----ARMVSKSKDGTGSDCKKAK----- 114	
изоформа 5	AAPRGKPVSRVPLKARIVSKSKDGTGSDCKKAKITSTRSSAKTLKNRPCLSKPHPTPGSS 420	
изоформа 6	AAPRGKPVSRVPLKARIVSKSKDGTGSDCKKAKITSTRSSAKTLKNRPCLSKPHPTPGSS 420	
эмбриональный	-----ARMVSKSKDGTGSDCKKAK-----	

Фиг. 6B

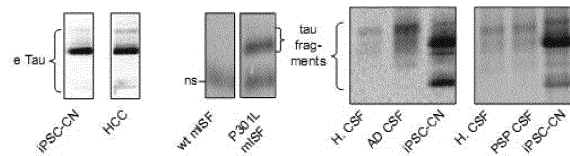
изоформа 2	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 163	
изоформа 3	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 105	
изоформа 4	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 105	
изоформа 5	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 134	
изоформа 6	DPLIQPSSPAVCEPPSSPKHVSSVTSRTGSGSAKEMKLGADGKTIATPRGAAPPGQK 480	
эмбриональный	DPLIQPSSPAVCEPPSSPKHVSSVTSRTGSGSAKEMKLGADGKTIATPRGAAPPGQK 480	
изоформа 2	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 163	
изоформа 3	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 105	
изоформа 4	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 105	
изоформа 5	-----GADGKTIATPRGAAPPGQK 134	
изоформа 6	DPLIQPSSPAVCEPPSSPKHVSSVTSRTGSGSAKEMKLGADGKTIATPRGAAPPGQK 480	
эмбриональный	DPLIQPSSPAVCEPPSSPKHVSSVTSRTGSGSAKEMKLGADGKTIATPRGAAPPGQK 480	
изоформа 2	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 265	
изоформа 3	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 207	
изоформа 4	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 207	
изоформа 5	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 600	
изоформа 6	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 582	
эмбриональный	PGSRRTPLSLPTPTTREPKKVAIVRTPPKSPSSAKSLQTAPVPHPLKNVSKIGSTEN 582	

Фиг. 6C

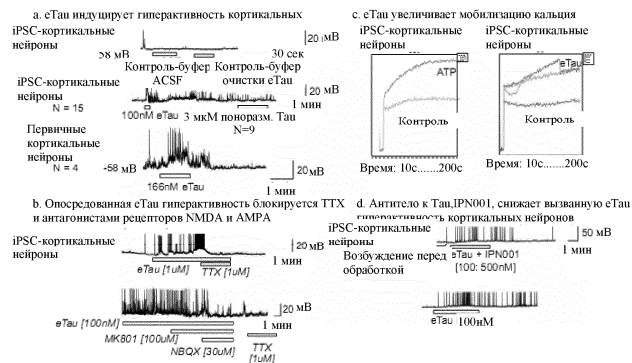
изоформа 2	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 325	
изоформа 3	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 247	
изоформа 4	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 236	
изоформа 5	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 236	
изоформа 6	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 460	
эмбриональный	LKHQFGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSGKDNKHNHVGGSVQIVYKPVLSKVTSCGSL 442	
изоформа 2	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 325	
изоформа 3	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 247	
изоформа 4	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 236	
изоформа 5	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 236	
изоформа 6	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 460	
эмбриональный	-----VQIVYKPVLSKVTSCGSL 442	
изоформа 2	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 385	
изоформа 3	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 327	
изоформа 4	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 296	
изоформа 5	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 356	
изоформа 6	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 702	
эмбриональный	GNIHKKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK 702	
изоформа 2	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 441 (SEQ ID NO:21)	
изоформа 3	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 383 (SEQ ID NO:22)	
изоформа 4	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 352 (SEQ ID NO:23)	
изоформа 5	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 412 (SEQ ID NO:24)	
изоформа 6	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 776 (SEQ ID NO:25)	
эмбриональный	TDHGAEIVYKSPVVSQDTSFRHLNVSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAHQGL 758 (SEQ ID NO:26)	

Фиг. 6D

Фрагменты Tau в кондиционированных средах, ISF
мышей P301L tau и CSF от AD и PSP



Фиг. 7



Фиг. 8

Вариант VH 1 IPN002

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTTCTATCTGGTGGAGTCTGGGGGGAGCCTTGTAGTGAAGCCTGGAGGCTCCCTGAGACTCTCTCTGTCAGCCTCTGGAATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V H 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      40      50      60      70      80      90      100
TGTCTTGGGTTCTGTCAGAGCTCCAGAGGAGGCTGGAGTGGTGGTCCAGCACTATAGTATAGTGGAGTCCAGCTCTATCCAGCACTATCCAGCACTATCCAGCA
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T V Y P D S V K G R
40      50      60      70      80      90      100
ATTCAACATCTCCAGAGCAATTCGCAAGAACACCTGTACCTGCAATGAGCACTCTGAGCTGTAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
F T I S R D N A K N T L Y L Q N S S L K S E D T A M Y Y C S I S H
70      80      90      100
GACGGTCTATGGAGTCTGGGGTCAAGGAGCCTGAGCAGCCTCTCTCTCA (SEQ ID NO:28)
D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:36)
100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 9

Вариант VH 2 IPN002

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTTCTATCTGGTGGAGTCTGGGGGGAGCCTTGTAGTGAAGCCTGGAGGCTCCCTGAGACTCTCTCTGTCAGCCTCTGGAATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V H 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      40      50      60      70      80      90      100
TGTCTTGGGTTCTGTCAGAGCTCCAGAGGAGGCTGGAGTGGTGGTCCAGCACTATAGTATAGTGGAGTCCAGCTCTATCCAGCACTATCCAGCACTATCCAGCA
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T V Y P D S V K G R
40      50      60      70      80      90      100
ATTCAACATCTCCAGAGCAATTCGCAAGAACACCTGTACCTGCAATGAGCACTCTGAGCTGTAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
F T I S R D N A K N T L Y L Q N S S L K S E D T A M Y Y C S I S H
70      80      90      100
GACGGTCTATGGAGTCTGGGGTCAAGGAGCCTGAGCAGCCTCTCTCTCA (SEQ ID NO:29)
D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:37)
100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 10

Вариант VH 3 IPN002

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTTCTATCTGGTGGAGTCTGGGGGGAGCCTTGTAGTGAAGCCTGGAGGCTCCCTGAGACTCTCTCTGTCAGCCTCTGGAATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V H 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      40      50      60      70      80      90      100
TGTCTTGGGTTCTGTCAGAGCTCCAGAGGAGGCTGGAGTGGTGGTCCAGCACTATAGTATAGTGGAGTCCAGCTCTATCCAGCACTATCCAGCACTATCCAGCA
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T V Y P D S V K G R
40      50      60      70      80      90      100
ATTCAACATCTCCAGAGCAATTCGCAAGAACACCTGTACCTGCAATGAGCACTCTGAGCTGTAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
F T I S R D N A K N T L Y L Q N S S L K S E D T A M Y Y C S I S H
70      80      90      100
GACGGTCTATGGAGTCTGGGGTCAAGGAGCCTGAGCAGCCTCTCTCTCA (SEQ ID NO:30)
D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:38)
100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 11

Вариант VH 4 IPN002

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTGAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGCGTTTACTGGAAGCGTGGAGGCTGCTGAGAGCTGCTGCTGCTGAGGCTTGGATTCACTTTCAGTAAATATGGCA
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 F Y G
      10      20      30
110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
TGTCTGTGGGTGCTGGAGGCTGGAGGCAAGGCGCTGAGTGGGTGGCAAGCTATTAGTAGTAGTAGTGGAGTCTGGAGCTTACTGTCTTGGAGTGTGAAAGGCGAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
      40      50      60
210      220      230      240      250      260      270      280      290     300
ATTCACCATCTCCAGAGACAAATGCCAAAGAACACCGTGTACCGTGCAAATGACAGTCTGAGAGCGAGGACACAGCCATGTATTAATGTGTCATTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q H N S L R A E D T A N Y Y C A I S W
      70      80      90
310      320      330      340      350
GACGCTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCAAGCTCAGCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:31)
D G A N D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:39)
      100      110      113

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 12

Вариант Vk 1 IPN002

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGTGATGACCCAAAGGCCACTCTCTCCCTGCTGTCAACGCTTGGACAGCGCGGCTCCATCTCTTGCAAACTAGTCAGAGCATTTACATAGTAAATG
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
GAAACACCTATTATGAAATGGTACCTGCAGAAACAGGCGAGTCTCCACAGCTCTGGTCTACAAAGTTTCCAAATCGATTCTTGGGGTCCAGACAGATT
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
CACTGGGATGGATCAGGAGACAGATTTCACACTCAGATCAGCAGAGTGGAGGCTAGGATGTGGGAACCTTATTAATCTTTCAGGGCTCACTTGTTCCT
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
TGGGCTTCTGGTGGAGGCCAACAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:32)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:40)
      100      106 A

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 13

Вариант Vk 2 IPN002

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGTGATGACCCAAAGGCCACTCTCTCCCTGCTGTCAACGCTTGGACAGCGCGGCTCCATCTCTTGCAAACTAGTCAGAGCATTTACATAGTAAATG
D V V H 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
GAAACACCTATTATGAAATGGTACCTGCAGAAACAGGCGAGTCTCCACAGCTCTGGTCTACAAAGTTTCCAAATCGATTCTTGGGGTCCAGACAGATT
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
CACTGGGATGGATCAGGAGACAGATTTCACACTCAGATCAGCAGAGTGGAGGCTAGGATGTGGGAACCTTATTAATCTTTCAGGGCTCACTTGTTCCT
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
TGGGCTTCTGGTGGAGGCCAACAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:33)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:41)
      100      106 A

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 14

Вариант Vk 3 IPN002

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGTGATGACCCAAAGGCCACTCTCTCCCTGCTGTCAACGCTTGGACAGCGCGGCTCCATCTCTTGCAAACTAGTCAGAGCATTTACATAGTAAATG
D V V H 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
GAAACACCTATTATGAAATGGTACCTGCAGAAACAGGCGAGTCTCCACAGCTCTGGTCTACAAAGTTTCCAAATCGATTCTTGGGGTCCAGACAGATT
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
CACTGGGATGGATCAGGAGACAGATTTCACACTCAGATCAGCAGAGTGGAGGCTAGGATGTGGGAACCTTATTAATCTTTCAGGGCTCACTTGTTCCT
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
TGGGCTTCTGGTGGAGGCCAACAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:34)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:42)
      100      106 A

```

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 15

035976

Вариант Vк 4 IPN002

[illegible]

Определения CDR и нумерация последовательностей белков представлены согласно Kabat. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR подчеркнуты

Фиг. 16

Таблица 4: Связывание вариантов IPN002 с eTau-белками

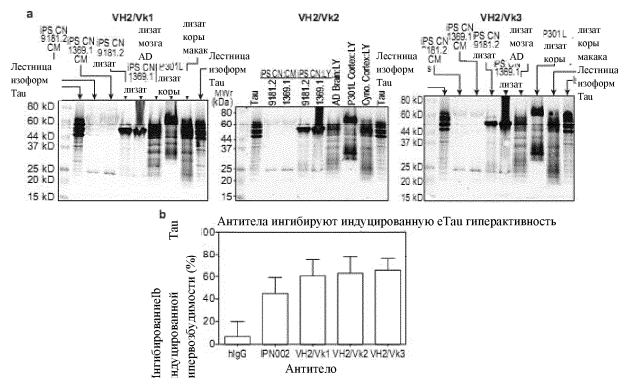
Антитело	K _D значения (М)						
	гТаш 1в3	гТаш 1в	гТаш 1б	гТаш 2	гТаш 4	гТаш 4	гТаш 4
VH1/VK1	1.83E+10	2.94E+10	7.37E+10	4.65E+10	3.58E+10	5.77E+10	
VH1/VK2	1.21E+10	2.12E+10	5.58E+10	3.81E+10	3.21E+10	6.33E+10	
VH1/VK3	1.75E+10	2.91E+10	5.90E+10	4.44E+10	4.78E+10	7.61E+10	
VH1/VK4	2.85E+10	2.52E+10	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	2.35E+10	2.91E+10	5.29E+10	7.05E+10	4.54E+10	9.21E+10	
VH3/VK2	2.55E+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	2.67E+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	3.52E+10	5.35E+10	5.64E+10	4.62E+10	1.03E+09	

ФИГ. 17

Таблица 5: Связывание гуманизированных вариантов IPN002 с Tau383

Антило	K_0 (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
VH1/VK1	4.6E-11	2.0E+05	8.75E-06
VH1/VK2	4.6E-10	1.9E+05	8.74E-05
VH1/VK3	1.2E-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

ФИГ. 18



ФИГ. 19

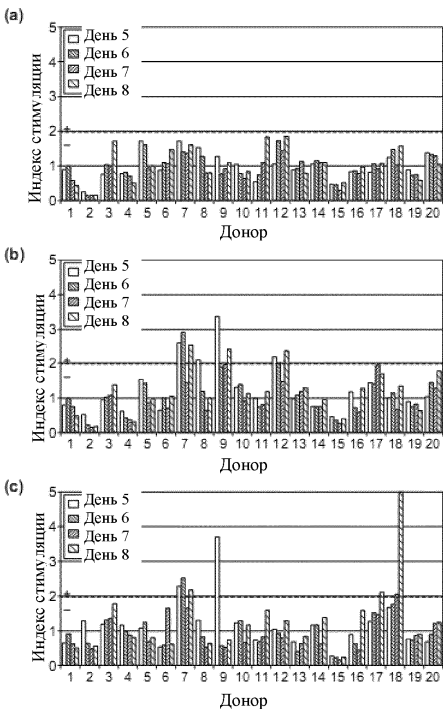
Эмбриональный MAEPQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#2 AEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#3 AEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
#4 AEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
eTau 2-172 AEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
eTau 2-176 AEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGVTMHDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA

Эмбриональный AGHVTQARVMSKSDGTGSDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIKATPPA
#2 AGHVTQARVMSKSDGTGSDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIKATPPA
#3 AGHVTQARVMSKSDGTGSDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIKATPPA
#4 AGHVTQAR (68) (SEQ ID NO:48)
eTau 2-172 AGHVTQARVMSKSDGTGSDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIKATPPA
eTau 2-176 AGHVTQARVMSKSDGTGSDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIKATPPA

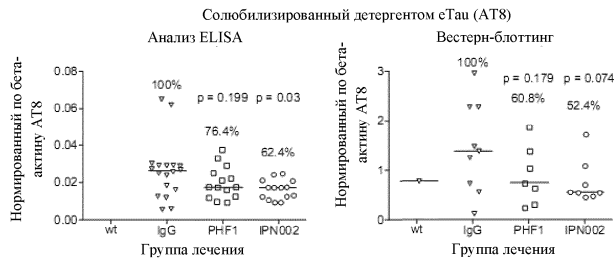
Эмбриональный FKTFPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTGSRRTSLTPPTREPKKVAVVTRTPFKSPSSA
#2 FKTFPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTGSR (151) (SEQ ID NO:46)
#3 FK (122) (SEQ ID NO:47)
eTau 2-172 FKTFPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTGSRRTSLTPPTREPKKVAVVTR (SEQ ID NO:44)
eTau 2-176 FKTFPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTGSRRTSLTPPTREPKKVAVVTRFK (SEQ ID NO:45)

Эмбриональный KSRLLQTAPVMPDLNKNVSKIGSTEMLNHQGGGVQIVYKPVOLSKVTSKCGSLGNHNK
Эмбриональный PGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRNKAKTDHGAEI
Эмбриональный VYKSPVSGDTSRNLNVSSTGSDIMVDSPLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:27)

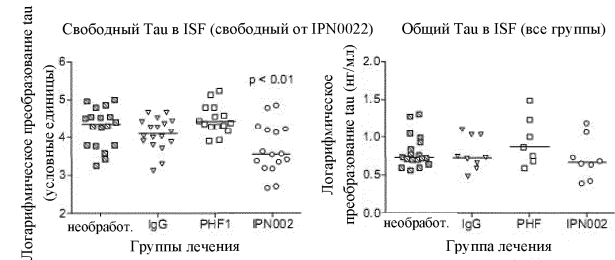
Фиг. 20



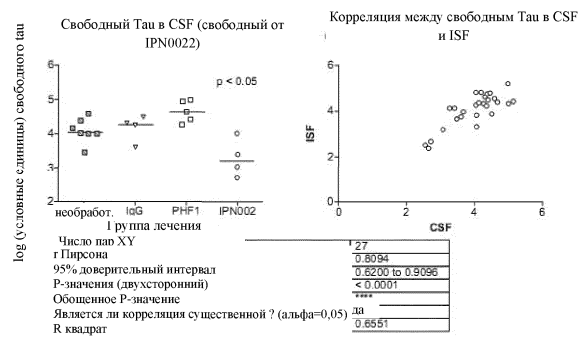
Фиг. 21



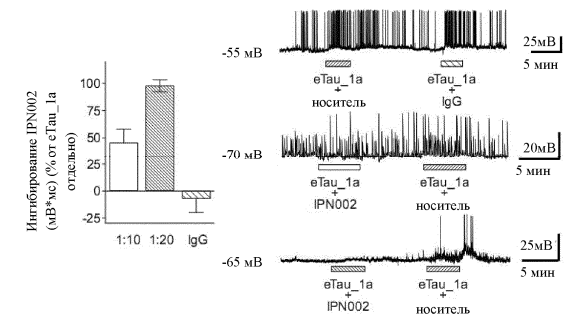
Фиг. 22



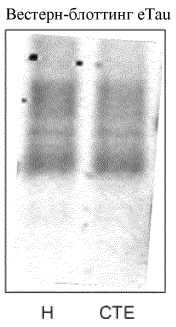
Фиг. 23



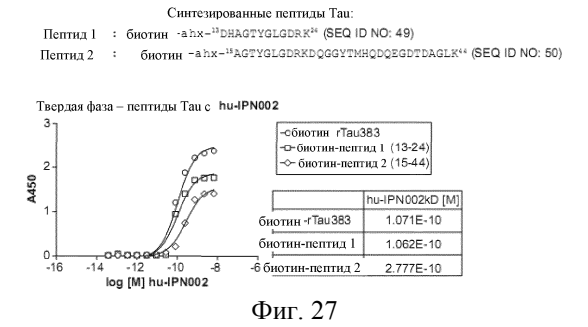
Фиг. 24



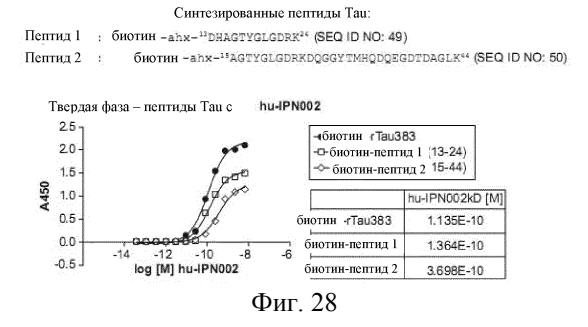
Фиг. 25



Фиг. 26

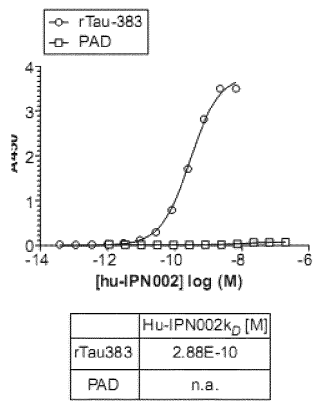


Фиг. 27



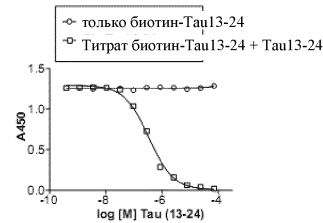
Фиг. 28

Анализ связывания с hu-IPN002

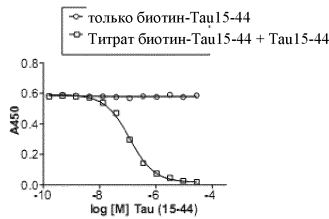


Фиг. 29

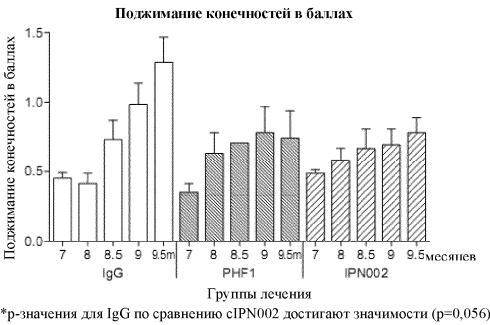
Анализ конкуренции биотин-Тau (13-24) с Tau (13-24) за hu-IPN002



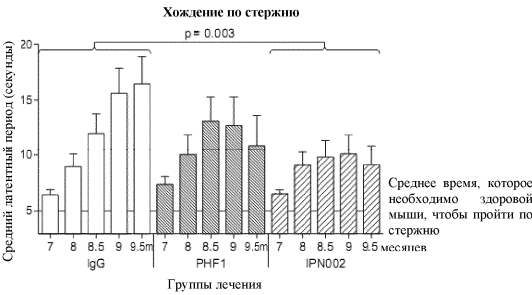
Анализ конкуренции биотин-Тau (15-44) с Tau (15-44) за hu-IPN002



Фиг. 30

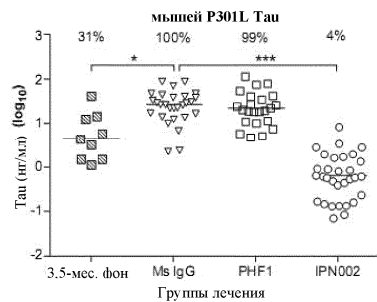


Фиг. 31



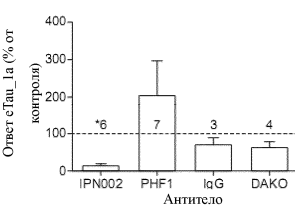
Фиг. 32

Свободный Тау (свободный от IPN002) в образцах CSF от



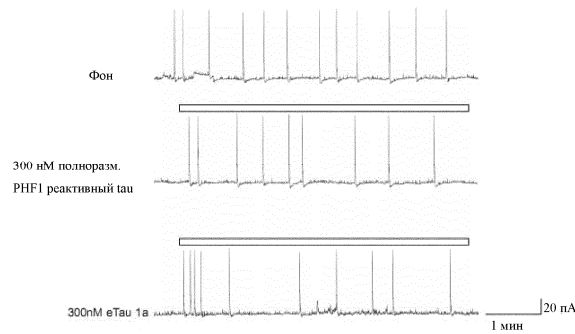
Фиг. 33

Ингибирование антителами ответа eTau 1a

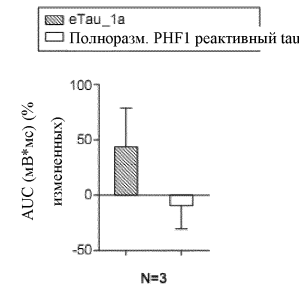


*Значения на графике представляют число нейронов, исследованных для каждого антитела

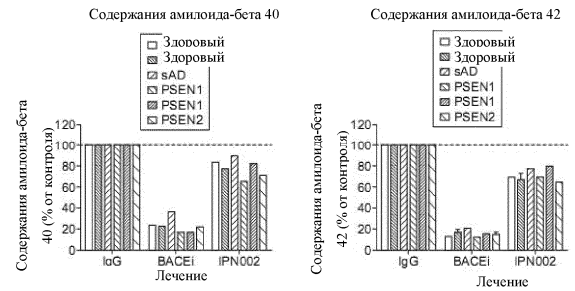
Фиг. 34



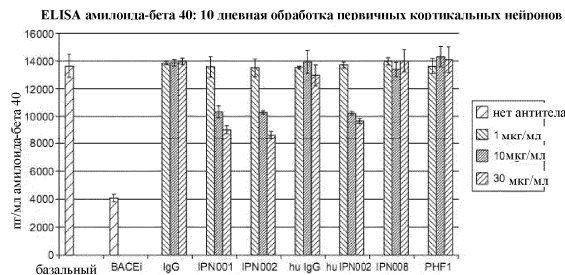
Фиг. 35



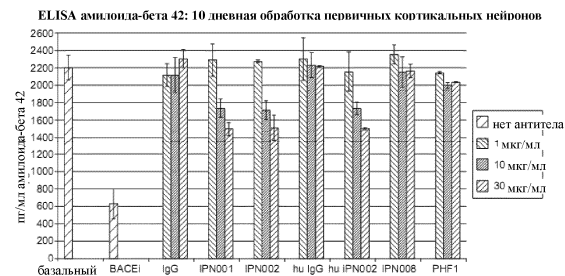
Фиг. 36



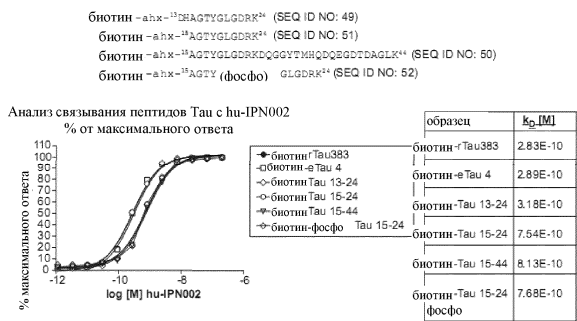
Фиг. 37



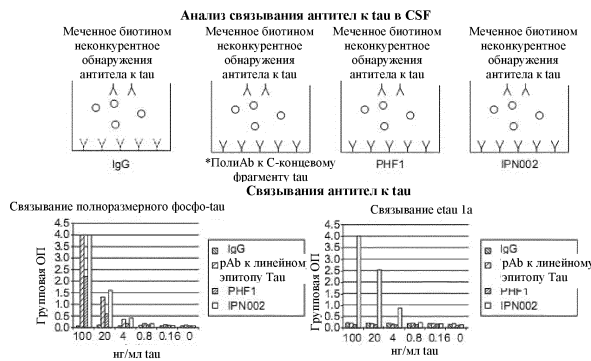
Фиг. 38



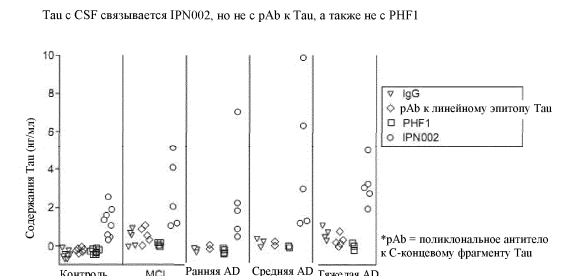
Фиг. 39



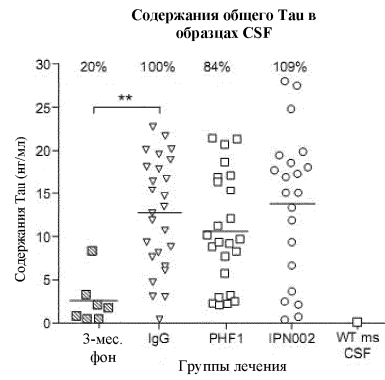
Фиг. 40



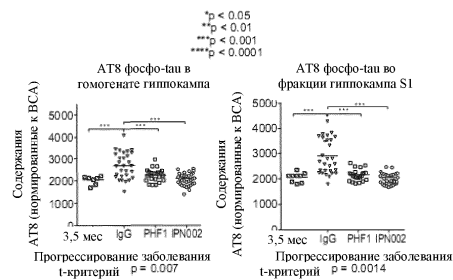
Фиг. 41



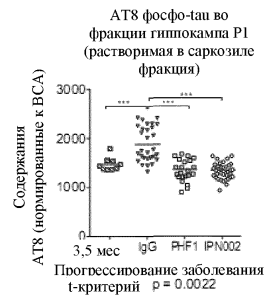
Фиг. 42



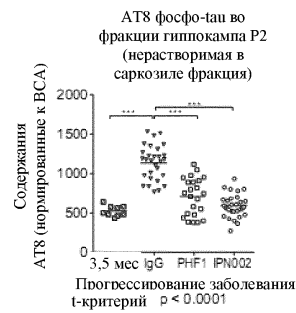
Фиг. 43



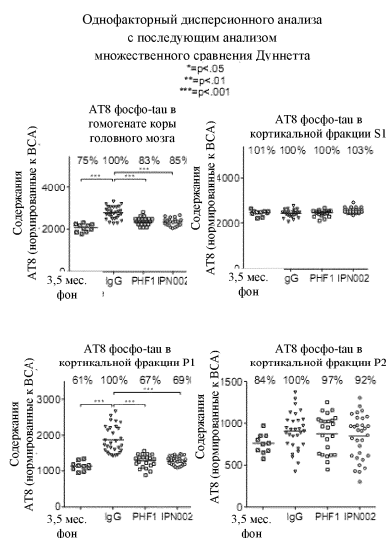
Фиг. 44А, 44В



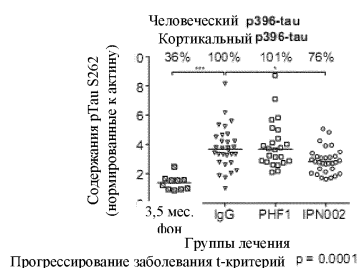
Фиг. 44С



Фиг. 44D



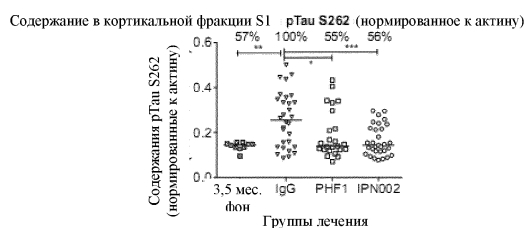
Фиг. 44Е-44Н



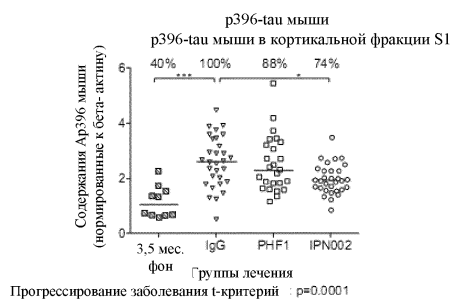
Фиг. 45А



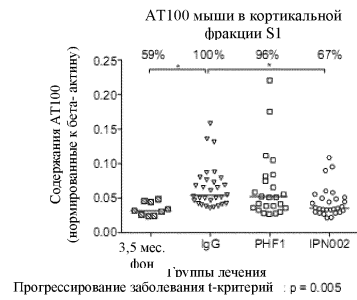
Фиг. 45В



Фиг. 45С



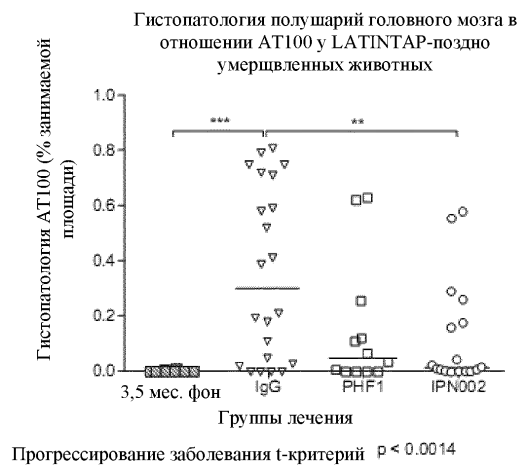
Фиг. 45D



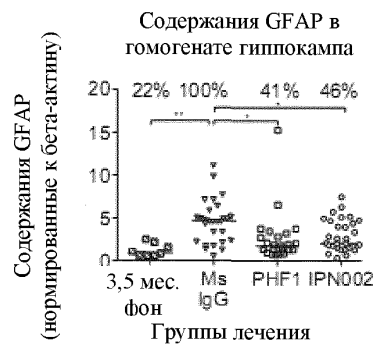
Фиг. 45Е



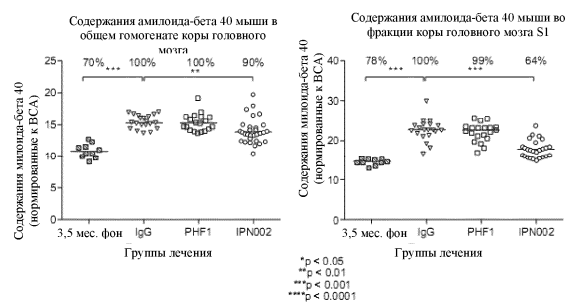
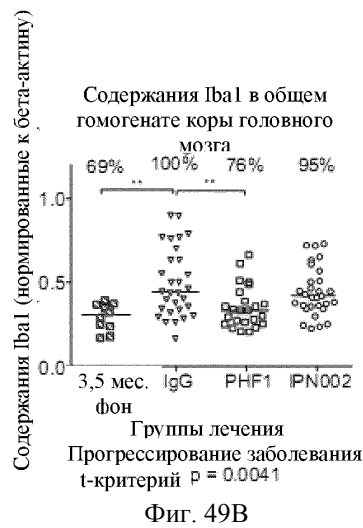
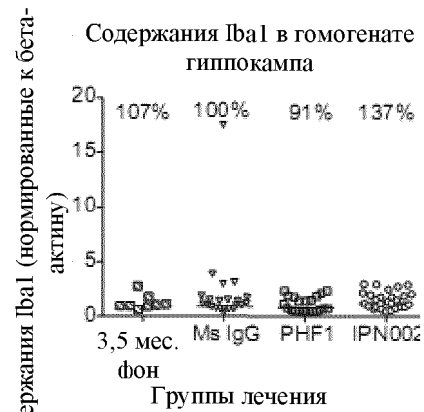
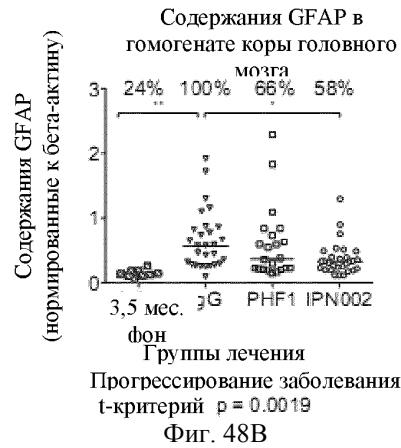
Фиг. 46

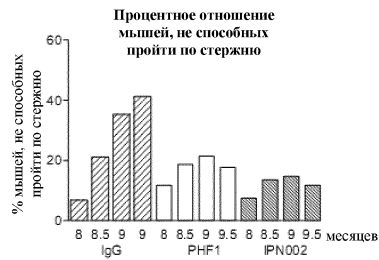


Фиг. 47

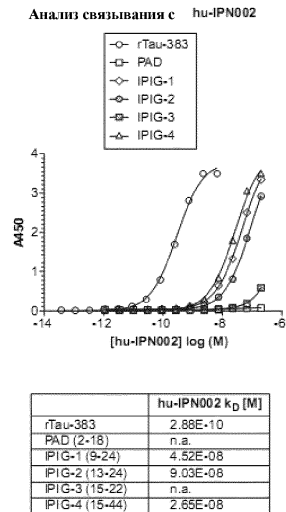


Фиг. 48А

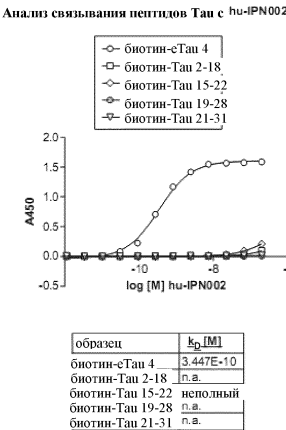




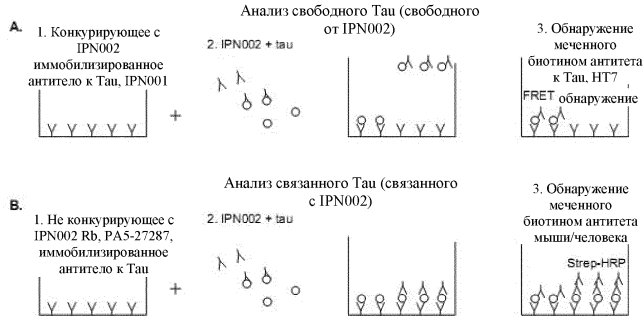
Фиг. 51



Фиг. 52



Фиг. 53



Фиг. 54