



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.23

(21) Номер заявки
201890169

(22) Дата подачи заявки
2016.07.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) ТАУ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА

(31) 15175519.6

(32) 2015.07.06

(33) EP

(43) 2018.10.31

(86) PCT/EP2016/065809

(87) WO 2017/005732 2017.01.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Тайсон Керри Луиз, Бейкер Теренс
Сьюард (GB), Мере-Козлло Жорж,
Дауни Патрик, Курад Жан-Филипп
(BE), Найт Дэвид Эдвард Ормонд (GB)**

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

(56) WO-A2-2013096380
WO-A2-2014028777
WO-A2-2010142423

MERCKEN M. ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODIES WITH SELECTIVE SPECIFICITY FOR ALZHEIMER TAU ARE DIRECTED AGAINST PHOSPHATASE-SENSITIVE EPITOPES", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 84, no. 3, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 265-272, XP008049337, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/BF00227819 Discussion; figure 7

MACCIONI R.B. ET AL.: "Anomalous phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF

correlates with cognitive impairment in MCI subjects", NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 27, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 237-244, XP024993014, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2005.01.011 [retrieved on 2006-02-01] cited in the application page 239, right-hand column, paragraph 3

BUEE L. ET AL.: "TAU PROTEIN ISOFORMS, PHOSPHORYLATION AND ROLE IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS", BRAIN RESEARCH REVIEWS, ELSEVIER, NL, vol. 33, no. 1, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 95-130, XP000974598, ISSN: 0165-0173, DOI: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9, page 99, left-hand column, last paragraph-right-hand column, paragraph first

HEIKO BRAAK ET AL.: "Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes", NEUROBIOLOGY OF AGING., vol. 16, no. 3, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 271-278, XP055219625, US ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/0197-4580(95)00021-6 the whole document
FLORENCE CLAVAGUERA ET AL.: ""Prion-Like" Templated Misfolding in Tauopathies", BRAIN PATHOLOGY., vol. 23, no. 3, 16 April 2013 (2013-04-16), pages 342-349, XP055219682, CH ISSN: 1015-6305, DOI: 10.1111/bpa.12044 the whole document

KIRAN YANAMANDRA ET AL.: "Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy", ANNALS OF CLINICAL AND TRANSLATIONAL NEUROLOGY, vol. 2, no. 3, 23 January 2015 (2015-01-23), pages 278-288, XP055223617, GB ISSN: 2328-9503, DOI: 10.1002/acn3.176 the whole document

(57) Изобретение относится, в частности, к терапевтическим и диагностическим Тау-связывающим антителам и их связывающим фрагментам, к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим легкую и/или тяжелую цепь такого антитела или его связывающего фрагмента, к клонирующему или экспрессирующему вектору, к клетке-хозяину, продуцирующей такое антитело, к применению указанных Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов в качестве терапевтически активного средства для лечения таупатий, причем таупатии представляют собой болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич. Кроме того, изобретение относится к применению Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов в качестве диагностического средства для диагностирования таупатии.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится, в частности, к терапевтическим и диагностическим Тау-связывающим антителам и их связывающим фрагментам, способам получения таких антител и их использования для лечения и/или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера; амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизм-деменция; болезнь аргирофильных зерен; хроническая травматическая энцефалопатия; кортикобазальная дегенерация; диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией; синдром Дауна; семейная британская деменция; семейная датская деменция; лобно-височная деменция и паркинсонизм, сцепленный с хромосомой 17, обусловленный мутациями MAPP; болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера; гваделупский паркинсонизм; миотоническая дистрофия; нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге; болезнь Ниманна-Пика, тип С; негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками; болезнь Пика; постэнцефалитический паркинсонизм; прионная церебральная амилоидная ангиопатия; прогрессирующий подкорковый глиоз; прогрессирующий надъядерный паралич; умственная отсталость, связанная с SLC9A6; подострый склерозирующий панэнцефалит; деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков; таупатия белого вещества с глобулярными глиальными включениями (Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349). Настоящее изобретение также относится к способам лечения человеческого субъекта, страдающего вышеописанными таупатиями или предположительно склонного к ним, в частности, к таким таупатиям, как болезнь Альцгеймера и прогрессирующий надъядерный паралич.

Предпосылки изобретения

Болезнь Альцгеймера (AD) и прогрессирующий надъядерный (PSP) представляют собой нейродегенеративные заболевания, с которыми связана высокая неудовлетворенная медицинская потребность, высокие расходы для систем общественного здравоохранения и значительное бремя для пораженных семей. Клинические признаки AD включают потерю памяти, когнитивной, аргументационной, рассудочной и эмоциональной стабильности и в конечном итоге смерть. PSP влечет за собой серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем походки и равновесием, падения, нарушение вертикальных движений глаз, когнитивные проблемы, депрессию, апатию и легкую деменцию. Поздние симптомы включают нечеткость зрения, неконтролируемые движения глаз, неразборчивую речь, затруднения при глотании и смерть.

В течение больше чем десяти лет программы по модификации заболевания AD были направлены на бета-амилоидный пептид через различные механизмы. В отличие от них значительно меньший прогресс достигнут в направленном воздействии на патологию внутриклеточного Тау, второй основной признак AD. Нейрофибриллярные включения или клубки, содержащие агрегированный, гиперфосфорилированный Тау, являются определяющей характеристикой AD патологии и многих других таупатий, включая PSP.

При этих заболеваниях существует выраженная корреляция между прогрессированием симптомов и уровнем и распределением интраневральных Тау-агрегатов. При AD нейрональные Тау-клубки сначала появляются в трансэнториальной коре, откуда они распространяются в гиппокамп и неокортекс. Клубки, наблюдаемые в AD нейронах, состоят из гиперфосфорилированного агрегированного нерастворимого Тау. Сделано предположение, что в заболевание вносят вклад непосредственные токсические эффекты патологических Тау-частиц и/или нарушение аксонального транспорта из-за секвестрации функционального Тау в гиперфосфорилированные и агрегированные формы, которые более не способны обеспечить аксональный транспорт.

В своем не патологическом состоянии Тау представляет собой хорошо растворимый цитоплазматический белок, связывающий микротрубочки, который встречается в центральной нервной системе человека (CNS) в 6 основных изоформах из-за альтернативного сплайсинга в диапазоне от 352 до 441 аминокислот в длину. Эти изоформы могут иметь ноль, одну или две N-концевых вставки (0N, 1N, 2N) и три или четыре последовательности C-концевого "повтора" (3R или 4R). Эти последовательности C-концевых повторов из 30-32 аминокислот, R1, R2, R3 и R4, вместе образуют область связывания микротрубочек Тау (MTBR). В действительности полагают, что основная роль Тау состоит в сборке и стабилизации аксональных микротрубочек. Микротрубочки образуют дорожки для аксонального транспорта и элементов цитоскелета для клеточного роста (Clavaguera et al., Brain Pathology 23 (2013) 342-349). Показано, что три изоформы Тау содержат три области связывания микротрубочек (MTBR):

изоформа 4, также обозначаемая как 3R0N, эталонная последовательность NCBI NP_058525.1 (352 аминокислоты),

изоформа 7, также обозначаемая как 3R1N, эталонная последовательность NCBI NP_001190180.1 (381 аминокислота),

изоформа 8, также обозначаемая как 3R2N, эталонная последовательность NCBI NP_001190181.1 (410 аминокислот).

Тогда как другие три изоформы Тау содержат четыре MTBR:

изоформа 2, также обозначаемая как 4R2N, эталонная последовательность NCBI NP_005901.2 (441 аминокислота),

изоформа 3, также обозначаемая как 4R0N, эталонная последовательность NCBI NP_058518.1 (383

аминокислота), и

изоформа 5, также обозначаемая как 4R1N, эталонная последовательность NCBI NP_001116539.1 (412 аминокислот).

Тау содержит 85 возможных участков фосфорилирования серина (S), треонина (T) и тирозина (Y). Многие фосфорилированные остатки на Тау находят в богатом пролином домене Тау, фланкирующем связывающий микротрубочки домен. Все шесть изоформ Тау присутствуют в нормальном зрелом головном мозге человека, и на этом этапе фосфорилирование Тау относительно снижено (Noble et al., 2013 Front Neurol. 2013; 4: 83). При различных таупатиях осевший Тау в патологических повреждениях неизменно сильно фосфорилирован. Фосфосерин 202 и фосфотреонин 205 обнаружены в агрегированном Тау из образцов головного мозга и цереброспинальной жидкости от пациентов PSP и с AD (Buée et al., Brain Research Reviews 33 (2000) 95-130; Wray et al. J Neurochem. 2008 Jun 1; 105 (6) :2343-52; Hanger et al., J Biol Chem. 2007 Aug 10; 282 (32) :23645-54; Maccioni et al. Neurobiol Aging. 2006 Feb; 27(2):237-44).

В настоящее время для этих заболеваний доступно только симптоматическое лечение, дающее слабый или нулевой эффект. В настоящее время не доступно лечение для замедления или, в идеале, остановки развития заболевания. Следовательно, в данной области сохраняется потребность в новых соединениях и композициях, которые можно использовать при лечении таупатий.

Цели и сущность изобретения

Цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы, в частности, предоставлять средства для лечения или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (AD) или прогрессирующий надъядерный паралич (PSP). Кроме того, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предоставить, в частности, способы лечения или диагностирования таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (AD) или прогрессирующий надъядерный паралич (PSP).

Эти и другие цели, как они будут видны из последующего описания, приведенного далее, достигаются посредством объекта изобретения по независимым пунктам формулы изобретения. Некоторые из конкретных аспектов и вариантов их осуществления, предполагаемых настоящим раскрытием, составляют объект изобретения по зависимым пунктам формулы изобретения. Другие аспекты и варианты их осуществления, как предусмотрено настоящим раскрытием, можно брать из последующего описания.

В первом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

Во втором аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

В третьем аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

В четвертом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 13 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 16 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

В пятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированным фрагментом Тау, содержащим аминокислоты с 197 до 206 из SEQ ID

NO: 55.

В качестве варианта осуществления первого и пятого аспектов раскрытие предусматривает антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела или их связывающие фрагменты.

В качестве варианта осуществления второго или третьего аспекта раскрытие предусматривает антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой химерные антитела или их связывающие фрагменты.

В качестве варианта осуществления четвертого аспекта раскрытие предусматривает антитела или их связывающие фрагменты, которые могут представлять собой гуманизированные антитела или их связывающие фрагменты.

В шестом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау, с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом по любому из аспектов с первого до четвертого и их вариантов осуществления.

В седьмом аспекте настоящее раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается, по существу, с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из аспектов с первого до пятого и их вариантов осуществления.

В качестве варианта осуществления шестого и седьмого аспектов раскрытие предусматривает моноклональные антитела или их связывающие фрагменты, которые представляют собой гуманизированные антитела или их связывающие фрагменты.

Антитела и их связывающие фрагменты по аспектам с первого до седьмого и их вариантам осуществления способны связываться с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека, которые содержат фосфорилированную область Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55.

В восьмом аспекте настоящее раскрытие предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, такие как ДНК последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепи антитела или связывающий фрагмент по аспектам с первого до седьмого и их вариантам осуществления.

В девятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает клонирующие или экспрессирующие векторы, содержащие эти указанные выше молекулы нуклеиновой кислоты.

В десятом аспекте настоящее раскрытие предусматривает клетки-хозяева, содержащие эти вышеуказанные молекулы нуклеиновой кислоты, клонирующие векторы или экспрессирующие векторы.

В одиннадцатом аспекте настоящее раскрытие предусматривает способы получения антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до седьмого и их вариантам осуществления.

В двенадцатом аспекте раскрытие относится к использованию антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до седьмого и их вариантам осуществления для лечения таупатий, таких как, в частности, AD и PSP.

Другой аспект раскрытия относится к использованию антител и их связывающих фрагментов по аспектам с первого до седьмого и их вариантам осуществления для диагностирования таупатий, таких как, в частности, AD и PSP.

Описание фигур

Фиг. 1 - связывание AB1, имеющего последовательность VL кролика (VL_AB1) SEQ ID NO: 7 и последовательность VH кролика (VH_AB1) SEQ ID NO: 8 с биотинилированным пептидом T197 по сравнению со связыванием с биотинилированными пептидами T174, T211, T230 и T396 в анализе ELISA в эксперименте 2.3.

Фиг. 2 - схема, которая иллюстрирует анализ агрегирования клеток в эксперименте 3.1.

Фиг. 3 - эффект Тау-связывающих антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 (A), и Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 (B), или отрицательного контрольного антитела IgG4 A33 (C) в анализе Тау агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека, полученных от людей-пациентов с PSP (PSP-PHF8) в качестве затравок.

Фиг. 4 - вестерн-блоттинг, показывающий связывающие свойства Тау-связывающего антитела AB1, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10, с Тау-содержащими лизатами из AD или PSP человека.

Фиг. 5 - A) представлена донорная VL из AB1 (VL AB1) SEQ ID NO: 7, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 53). B) представлена последовательность VL акцепторной области IGKV1-39 человека с SEQ ID NO: 44, где подчеркнуты CDR 1, 2 и 3. C) представлена последовательность gVL4 AB1 SEQ ID NO: 11 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 53). D) представлена последовательность gVL9_AB1 SEQ ID NO: 12 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID

NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 54); CDR3 содержит мутацию A91 по сравнению с VL_AB1.

Фиг. 6 - А) представлена донорная VH из AB1 (VH_AB1) SEQ ID NO: 8, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 5) и 3 (SEQ ID NO: 48). В) представлена последовательность VH акцепторной области IGHV4-39 человека с SEQ ID NO: 45, где подчеркнуты акцепторные CDR 1, 2 и 3. С) представлена последовательность gVH41_AB1 SEQ ID NO: 14 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 5) и 3 (SEQ ID NO: 49). Донорные остатки показаны курсивным и полужирным начертанием: K71 и V78. Мутации в каркасе выделены (E1). CDR3 содержит замену N100Q по сравнению с VH_AB1. D) представлена последовательность gVH49_AB1 SEQ ID NO: 15 с пересаженными CDR, где подчеркнуты CDR 1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 5) и 3 (SEQ ID NO: 50). Донорные остатки показаны курсивным и полужирным начертанием (K71 и V78). Мутации в каркасе выделены (E1). CDR3 содержит замену N100A по сравнению с VH_AB1.

Фиг. 7 - эффект Тау-связывающих антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 9 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 10, и Тау-связывающего антитела AT8, описанного в литературе, в виде связывания с эпитопом, содержащим фосфорилированные остатки 202 и 205 в SEQ ID NO: 55, или отрицательного контроля антитела 101.4 в анализе Тау агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека, полученных у пациентов-людей с AD, в качестве затравок.

Фиг. 8 - эффект Тау-связывающих антител, имеющих легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20, в анализе Тау агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека, полученных у пациентов-людей с AD или людей-пациентов с PSP или пациентов-людей с FTD, в качестве затравок.

Подробное описание изобретения

Настоящее раскрытие, как иллюстративно описано в дальнейшем, можно подходящим образом реализовать на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не описанных в настоящем описании.

Настоящее раскрытие описано в отношении конкретных аспектов и вариантов его осуществления и со ссылкой на определенные фигуры и примеры, но изобретение не ограничено ими.

Технические термины используют в их обычном значении, если не указано иное. Если определенным терминам присваивают конкретное значение, определения терминов приведены далее в контексте, в котором термины используют.

Когда термин "содержит" используют в настоящем описании и формуле изобретения, он не исключает другие элементы. Для целей настоящего раскрытия термин "состоит из" считают предпочтительным вариантом осуществления термина "содержит". Если далее в настоящем описании определяют группу, которая содержит, по меньшей мере, определенное число вариантов осуществления, это также следует понимать как раскрытие группы, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления.

Для целей настоящего раскрытия термин "полученный" считают предпочтительным вариантом осуществления термина "допускающий получение". Если далее в настоящем описании, например, антитело определяют как допускающее получение из конкретного источника, это также подлежит понимать как раскрытие антитела, которое получают из этого источника.

Когда используют форму единственного числа, это включает множественное число, пока что-либо еще не будет установлено конкретно. Термин "приблизительно" обозначает интервал точности, понятный специалисту в данной области, который все еще гарантирует технический эффект рассматриваемого признака. Термин обычно указывает на отклонение от приведенного числового значения $\pm 10\%$ и предпочтительно $\pm 5\%$.

Следует понимать, что какое-либо упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте в качестве предпочтительного варианта осуществления по различным аспектам предусматривает моноклональные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

Для различных аспектов в настоящем раскрытии отмечены антитела и их связывающие фрагменты, содержащие CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и/или тяжелых цепей. Антитела или их связывающие фрагменты, содержащие только переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи, можно использовать, например, для способов изготовления или, например, для скрининга переменных областей, которые могут эффективно ассоциировать с соответствующей другой переменной областью. Однако следует понимать, что независимо от того, отсылают ли к антителам и их связывающим фрагментам, содержащим CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и/или тяжелых цепей, это всегда предусматривает в качестве предпочтительного варианта осуществления антитела и их связывающие фрагменты, содержащие CDR и переменные области из соответствующих областей легких цепей и тяжелых цепей.

Как используют в настоящем описании, термины "лечение", "лечить" и т.п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в отношении частичного или полного излечения заболевания и/или нежела-

тельного эффекта, свойственного заболеванию. Лечение, таким образом, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но ему еще не поставлен диагноз в качестве имеющего его; (b) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития; и (с) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регресса заболевания.

Упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте как о "терапевтически активном средстве" относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в лечении заболевания.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, которое при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для того, чтобы вызывать такое лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество варьирует в зависимости от Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

Упоминание о Тау-связывающем антителе или его связывающем фрагменте как о "диагностически активном средстве" относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента при диагностировании заболевания.

"Диагностически эффективное количество" относится к количеству Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, которое при использовании в диагностическом тесте на биологическом образце является достаточным для того, чтобы сделать возможной идентификацию заболевания или мониторинг количества больной ткани в качестве средства мониторинга эффекта терапевтического вмешательства.

Настоящая заявка основана отчасти на идентификации антитела, обозначаемого AB1, которое связывает Тау человека. Как принято в данной области, нумерация остатков Тау в этом тексте относится к Тау изоформы 2 с SEQ ID NO: 55 (эталонная последовательность NCBI: NP_005901.2). Как указано далее в настоящем описании, AB1 выделяли у иммунизированного кролика и оно распознает фосфорилированную область Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55.

В примерах установлено, что AB1 способно связываться с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека (см. пример 2.4) и что AB1 способно обнаруживать интранейрональные нейрофибрилярные клубки (NFT), экстранейрональные NFT, нейретические бляшковидные структуры и нейропильные нити на криосрезках образцов человека (см. пример 3.2). Кажется обоснованным допущение о том, что эти свойства, по меньшей мере, отчасти опосредованы определяющими комплементарность областями (CDR) варибельной области легкой цепи (VL) и варибельной области тяжелой цепи (VH) AB1.

В этой связи настоящее раскрытие предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие CDR или определяющие специфичность остатки области VL в AB1 (SEQ ID NO: 7) и/или CDR области VH в AB1 (SEQ ID NO: 8).

Остатки в варибельных доменах антитела стандартно нумеруют в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Эта система изложена в Kabat et al., 1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Kabat et al. (выше)"). Эту систему нумерации используют в настоящем описании, за исключением того, где это иначе указано.

Обозначения остатков по Kabat не всегда соответствуют непосредственно линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, нежели в строгой нумерации по Kabat, которые соответствуют укорочению или inserции в структурном компоненте, будь-то каркас или определяющая комплементарность область (CDR), базовой структуры варибельного домена. Правильную нумерацию остатков по Kabat можно определять для данного антитела посредством выравнивания гомологичных остатков последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, нумерованной по Kabat. Однако в соответствии с Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, идет от остатка 26 к остатку 32.

CDR1, CDR2 и CDR3 из VL из AB1, таким образом, идентифицировали как соответствующие SEQ ID NO: № 1, 2 и 53 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 из VH из AB1, таким образом, идентифицировали как соответствующие SEQ ID NO: № 4, 5 и 48 соответственно. Эффект замен, добавлений и/или делеций аминокислот в CDR может легко тестировать специалист в данной области, например, с использованием способов, описанных в примерах. В исходно идентифицированной CDR3 из VH (CDRH3), а именно SEQ ID NO: 48, например, потенциальный участок дезамидирования аспарагина идентифицировали и модифицировали посредством замены остатка аспарагина на глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту или серин. Это давало последовательности SEQ ID NO: 49, 50, 51 и 52 соответственно для CDRH3. С целью лаконичности три последовательности для CDRH3, а именно SEQ ID NO: № 48, 49, 50, 51 и 52 комбинировали в виде SEQ ID NO: 6. Аналогичным образом, в CDR3 из VL (CDRL3) потенциальный участок дезамидирования глутамина идентифицировали и модифицировали посредством замены примыкающего глицина на аланин. Это давало последовательность SEQ ID NO: 54. С целью лаконичности обе последовательности для CDRL3, а именно SEQ ID NO: 53 и 54, комбинировали в виде SEQ ID

NO: 3.

Следует принимать во внимание, что дополнительные модификации, такие как замены, добавления и/или делеции, можно создавать в CDR, по существу, не изменяя, например, связывающие свойства по сравнению с AB1. В первую очередь, этого можно достигать, например, посредством замены аминокислот в CDR на схожие аминокислоты. "Сходство", как используют в настоящем описании, указывает на то, что в каком-либо конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток относится к схожему типу между последовательностями. Например, лейцином можно заменять изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены на другие, включают, но не ограничиваясь этим:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи) и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

В этой связи раскрытие предусматривает в одном из аспектов выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В дополнительном аспекте раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и

тяжелую цепь.

В дополнительном аспекте раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь; и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей.

"Идентичность", как используют в настоящем описании, указывает на то, что в каком-либо конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. Степень идентичности можно легко вычислять, например, с использованием программного обеспечения BLAST™, которое доступно в NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J.K. Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

Идентичность CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 по отношению к SEQ ID NO: № 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно может составлять по меньшей мере 90%, но также может быть выше, например по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 5 и 6 соответственно. Раскрытие также предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 53 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 5 и 6 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: № 4, 5 и 6 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: № 1, 2, 3 соответственно и VH с

CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 48 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 49 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 50 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 50 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 51 соответственно, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 3 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 52 соответственно. Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 53 соответственно, и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 48 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 53 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 49 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 53 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 50 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 53 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 51 соответственно, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 53 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 52 соответственно; Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 48 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 49 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 50 соответственно, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 51 соответственно, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL с CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO:№ 1, 2, 54 соответственно и VH с CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO:№ 4, 5 и 52 соответственно.

Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, как предусмотрено указанным первым аспектом, могут содержать эти CDR, встроенные в каркасные области из другого источника. Таким образом, CDR могут содержаться в исходных каркасных областях AB1, а именно область VL кролика SEQ ID NO: 7 и область VH кролика SEQ ID NO: 8. Однако CDR также можно встраивать в каркасные области, происходящие от других биологических видов, такие как каркасные области мыши или человека. В зависимости от источника каркасных областей и константных областей, которые можно комбинировать с такими каркасными областями, можно получать химерные, муринизированные или гуманизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

Химерные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут содержать CDR в каркасных областях из источника, не относящегося к человеку, в комбинации с константными областями от других биологических видов, такого как источник мышь или человек. Муринизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут содержать CDR в каркасных областях из источника мыши в комбинации с константными областями из источника мыши. Гуманизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут содержать CDR в каркасных областях из источника человека в комбинации с константными областями из источника человека.

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Идентичность VL и VH по отношению к SEQ ID NO:№ 7 и 8 соответственно может составлять по меньшей мере 80%, но также может быть выше, например по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их свя-

зываются фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8.

Настоящим раскрытием, в частности, предусмотрены гуманизированные Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты.

С этой целью CDR можно пересаживать в каркасные области человека. Следует принимать во внимание, что идентификации такого гуманизованного Тау-связывающего антитела с пересаженными CDR или его связывающего фрагмента можно достигать, следуя общепринятым подходам в данной области. Когда пересаживают CDR или определяющие специфичность остатки, можно использовать любую подходящую акцепторную каркасную последовательность варибельной области человека, учитывая класс/тип донорного антитела, из которого получают CDR (см., например, 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., европейскую патентную заявку № 0519596 A1).

Также в варибельной области антитела с пересаженными CDR по настоящему изобретению каркасные области не обязаны иметь точно ту же последовательность, что и у акцепторного антитела. Таким образом, CDR можно пересаживать с изменениями каркаса или без них. Введение изменений каркаса на основании сравнения между каркасными областями донорных варибельных областей и акцепторных каркасных областей может позволять сохранять, например, аффинность антитела, которая иначе может быть снижена вследствие гуманизации. Например, редкие остатки можно изменять на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторных цепей. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях можно изменять с тем, чтобы они соответствовали остатку, найденному в том же положении в донорном антителе (см. Riechmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения следует сохранять на необходимом минимуме, чтобы восстанавливать аффинность донорного антитела. Остатки для изменения можно выбирать, используя протокол, описанный Adair et al. (1991) (Humanised antibodies. WO 91/09967). В антителе с пересаженными CDR по настоящему изобретению акцепторные тяжелую и легкую цепи не обязательно получать из того же антитела, и, при желании, оно может содержать композитные цепи, имеющие каркасные области, полученные из различных цепей.

Примеры акцепторных каркасов человека, которые можно использовать в настоящем изобретении, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи и EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, можно использовать последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу: <http://vbase.mrc-se.cam.ac.uk/> или <http://www.imgt.org>. Настоящее раскрытие, в частности, предусматривает использование V-области IGKV1-39 человека плюс J-области JK4 SEQ ID NO: 44 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) в качестве акцепторной каркасной области для CDR легкой цепи и V-области IGHV4-39 человека плюс J-область JH4 SEQ ID NO: 45 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) в качестве акцепторной каркасной области для CDR тяжелых цепей. В SEQ ID NO: 45 положения 1, 73 и 80 можно рассматривать, например, для изменения остатков в каркасных областях. Остаток глутамина в положении 1 можно изменять на глутамат. Остаток валина в положении 73 можно изменять на лизин. Фенилаланин в положении 80 можно изменять на валин. Другими положениями в SEQ ID NO: 45 для изменения остатков в каркасных областях могут быть положения 39 и/или 75. Например, остаток изолейцина в положении 39 в SEQ ID NO: 45 можно изменять на валин. Остаток треонина в положении 75 можно изменять на серин. Положениями в SEQ ID NO: 44 для изменения остатков в каркасных областях могут быть положение 2 и/или 63. Например, остаток изолейцина в положении 2 в SEQ ID NO: 44 можно изменять на валин, остаток серина в положении 63 в SEQ ID NO: 44 можно изменять на лизин.

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

варибельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Раскрытие дополнительно предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

варибельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 13 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 16 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать варибельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 13 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 14, 15 или последовательности,

по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Кроме того, такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 11, 12 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 16 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 11 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 14, 15 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 12 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 14, 15 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

Идентичность VL и VH по отношению к SEQ ID NO: № 13 и 16 соответственно может составлять по меньшей мере 80%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR.

В этом контексте заявка, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 11 и VH SEQ ID NO: 14, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 11 и VH SEQ ID NO: 15, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 12 и VH SEQ ID NO: 14, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие VL SEQ ID NO: 12 и VH SEQ ID NO: 15.

Гуманизированные Тау-связывающие антитела с пересаженными CDR или их связывающие фрагменты могут содержать константные области из источника человека. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, антитела или иммуноглобулины делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них дополнительно можно делить на подклассы (субтипы), например IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1 и IgA2. В частности, можно использовать домены константных областей IgG человека, в частности, изоформ IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтического использования и необходимы эффекторные функции антитела. Альтернативно, можно использовать изоформы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не необходимы. Настоящее раскрытие, в частности, предусматривает гуманизированные антитела субтипа IgG1 и IgG4.

Следует принимать во внимание, что также можно использовать дополнения последовательностей этих доменов константных областей. Например, одну или несколько аминокислот, например 1 или 2 замены, добавления и/или делеции аминокислот также можно выполнять в константных доменах антитела без значительного изменения способности антитела связываться с Тау. Также можно использовать молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 изменен на пролин, как описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108.

Эффекторные функции антитела включают ADCC и CDC. ADCC относится к антителозависимой клеточной цитотоксичности. Для того чтобы определять, способно ли антитело в принципе опосредовать ADCC, ADCC можно измерять *in vitro* с помощью, например, так называемого анализа высвобождения Cr⁵¹, Eu и S³⁵. Клетку-мишень, содержащую антиген, представляющий интерес, т.е. Тау, можно метить этими соединениями. После связывания терапевтического антитела клетки промывают и эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, такие как FcγRIII, совместно инкубируют с клетками-мишенями, мечеными антителом, и можно осуществлять мониторинг лизиса клеток-мишеней по высвобождению меток. В другом подходе используют так называемый анализ aCella TOX™. CDC относится к комплементзависимой клеточной цитотоксичности. Для того чтобы определять, способно ли антитело в принципе опосредовать CDC, CDC можно измерять *in vitro*, как описано, например, в Delobel A. et al, *METHODS Mol Biol.* (2013); 988:115-43 или в *Current Protocols in Immunology*, Chapter 13 Complement (Print ISSN: 1934-3671).

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 20, 21 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, 18 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, 18 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 20, 21 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

Идентичность легкой цепи и тяжелой цепи по отношению к SEQ ID NO: № 19 и 22 соответственно может составлять по меньшей мере 70%, но также может быть выше, например по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для каркасных областей по сравнению с CDR и еще больше гибкости для константных областей.

В этом контексте заявка, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 21, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 18 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 18 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 21.

Кроме того, раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 25 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

Такое выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 17, 18 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные им, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им.

В этом контексте заявка, в частности, предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 23, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 24, Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 18 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 23, и Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь SEQ ID NO: 18 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 24.

Идентичность легкой цепи и тяжелой цепи по отношению к SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: № 23 или 24 соответственно может быть по меньшей мере 70%, но также может быть выше, например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%, причем необязательно предпочтительны более высокие идентичности. Положения другой идентичности можно выбирать в соответствии с соображениями сходства. Следует принимать во внимание, что в отношении идентичности может быть больше гибкости для

каркасных областей по сравнению с CDR и еще больше гибкости для константных областей.

Также настоящее раскрытие предусматривает конкретную область или эпитоп Тау человека, которые связывает антитело или его связывающий фрагмент, предусмотренные настоящим раскрытием, в частности, антитело или его связывающий фрагмент, содержащие какую-либо одну из CDR-H1 (SEQ ID NO: 4), CDR-H2 (SEQ ID NO: 5), CDR-H3 (SEQ ID NO: 6), CDR-L1 (SEQ ID NO: 1), CDR-L2 (SEQ ID NO: 2) или CDR-L3 (SEQ ID NO: 3), например антитела, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VL SEQ ID NO: 8.

Кроме того, настоящее раскрытие предусматривает конкретную область или эпитоп Тау человека, в частности фосфорилированную область Тау в пределах аминокислот 197-206 в SEQ ID NO: 55, которую связывает антитело или его связывающий фрагмент, предусмотренные в настоящем раскрытии, в частности антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8.

Область Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55 содержит четыре возможных участка фосфорилирования, соответствующие остаткам серина в положениях 198 (S198), 199 (S199), 202 (S202) и остатку треонина в положении 205 (T205).

Термин "фосфорилированная область Тау в пределах аминокислот 197-206 из SEQ ID NO: 55" относится к области Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55, содержащее по меньшей мере один фосфорилированный остаток, выбранный из S198, S199, S202 и T205. Как знают специалисты в данной области, фосфорилированные остатки также можно обозначать, например, как Ser(PO₃H₂) или Thr(PO₃H₂).

Связывание Тау-связывающего антитела с этой конкретной областью или эпитопом Тау можно идентифицировать с помощью любого подходящего способа картирования эпитопов, известного в данной области, в комбинации с каким-либо одним из антител, предусмотренных настоящим раскрытием. Примеры таких способов включают скрининг пептидов различной длины, получаемых из SEQ ID NO: 55, на связывание Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов по настоящему раскрытию с самым маленьким фрагментом, способным специфически связываться с антителом, который содержит последовательность эпитопа, распознаваемого Тау-связывающими антителами или их связывающими фрагментами. Учитывая существование различных изоформ Тау в центральной нервной системе, следует понимать, что любую такую изоформу можно использовать в способах, изложенных в настоящем описании. В конкретном примере можно использовать самую длинную изоформу Тау, т.е. изоформу 2, как определено в SEQ ID NO: 55. Пептиды Тау с SEQ ID NO: 55 можно получать рекомбинантно, синтетически или посредством протеолитического расщепления полипептида Тау. Пептиды, которые связываются с антителом, можно идентифицировать, например, посредством Вестерн-блоттинга или масс-спектрометрического анализа. В другом примере ЯМР-спектроскопию или рентгеновскую кристаллографию можно использовать для того, чтобы идентифицировать эпитоп, связываемый Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом. После идентификации эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, можно использовать, если необходимо, в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связывают тот же эпитоп. Кроме того, эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, можно использовать для получения белков, которые связываются с тем же эпитопом и, если необходимо, по меньшей мере ингибируют агрегирование Тау, таких как соединения белков или полипептидов, содержащие больше чем 10 аминокислот, которые основаны на белковых каркасах, например, из липокалина ("антикалина"), фибронектина ("аднектины", тринектины), доменов Кунитца, лектина С-типа, трансферрина, гамма-кристаллина, цистеиновых узлов, анкириновых повторов ("DARPin") или белка А ("аффите-ла"), как известно в данной области (Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004). Дополнительно молекулы, которые связывают тот же эпитоп, включают дополнительные органические молекулы, включая пептиды и циклические пептиды, содержащие не больше чем 10 аминокислот, а также пептидомиметики. Пептидомиметики представляют собой соединения, которые основаны на аминокислотных последовательностях, встречающихся в участках белок-белкового взаимодействия, и известны в данной области (Sillerud and Larson, 2005).

В этой связи раскрытие предусматривает в другом аспекте выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55.

Такие антитела могут быть химерными, муринизированными, гуманизированными или полностью человеческими моноклональными антителами или их можно использовать для получения химерных, муринизированных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

В другом аспекте раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55, где указанная фосфорилированная область Тау содержит по меньшей мере один фосфорилированный остаток, выбранный из S198, S199, S202 и T205.

В другом аспекте раскрытие предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связыва-

мент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом, описанным выше.

В этом контексте раскрытие, в частности, предусматривает выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом, содержащим VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8.

Такие антитела могут представлять собой химерные, муринизированные, гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела, или их можно использовать для получения химерных, муринизированных, гуманизированных или полностью человеческих моноклональных антител.

Конкуренцию за связывание с Тау можно определять по уменьшению связывания антитела или его связывающего фрагмента с Тау по меньшей мере приблизительно на 50%, или по меньшей мере приблизительно на 70%, или по меньшей мере приблизительно на 80%, или по меньшей мере приблизительно на 90%, или по меньшей мере приблизительно на 95%, или по меньшей мере приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% в присутствии эталонного антитела или его связывающего фрагмента, которые могут содержать VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8 или VL SEQ ID NO: 9 и VH SEQ ID NO: 10. Связывание можно измерять с использованием поверхностного плазмонного резонанса на оборудовании BIAcore®, различных технологий обнаружения флуоресценции (например, флуоресцентной корреляционной спектроскопии, флуоресцентной взаимной корреляции, измерения времени жизни флуоресценции и т.д.) или радиоиммунного анализа различных типов или других анализов, используемых для того, чтобы отслеживать связывание антитела молекулой-мишенью.

Термин "Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент" обозначает, что антитело или его связывающие фрагменты специфически связываются с Тау посредством своих переменных областей, т.е. связывают антиген Тау с более высокой аффинностью, чем другие антигены, которые не являются гомологами для Тау. "Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент" связывается с Тау посредством своих переменных областей с аффинностью, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10, 20, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 или по меньшей мере в 10^6 раз большей, чем с другими антигенами, которые не являются гомологами Тау. Понятно, что Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, тем не менее, также могут взаимодействовать с другими белками (такими как белок A S. aureus или другие антитела в способах ELISA) через взаимодействия с последовательностями вне переменной области Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов. Не подразумевается, что такие последние связывающие свойства, которые опосредованы последовательностями вне переменных областей Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов, и, в частности, константными областями Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов, охвачены термином "Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент". Анализ скрининга для определения специфичности связывания антитела хорошо известен и обычно практикуется в данной области. Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты могут иметь равновесную константу диссоциации (K_D) для аффинности связывания антитела (или его связывающего фрагмента) с его антигеном в наномолярном диапазоне. Таким образом, K_D может быть ниже приблизительно 1×10^{-6} , например приблизительно ниже 5×10^{-7} , например приблизительно 2×10^{-7} или ниже, и ее можно измерять с использованием, например, поверхностного плазмонного резонанса и устройства BIAcore, как описано в примерах.

Как указано выше, настоящее раскрытие предусматривает Тау-связывающие антитела или их связывающие фрагменты. Полноразмерное антитело содержит константный домен и переменную область. Константная область не должна присутствовать в своем полном размере в антигенсвязывающем фрагменте антитела. Однако следует понимать, что независимо от того, рассмотрено ли в заявке использование антител, опосредующих ADCC и/или CDC, связывающий фрагмент должен содержать константную область достаточной длины, чтобы оставаться способным опосредовать ADCC и/или CDC.

Как указано выше, настоящее раскрытие также относится к связывающим Тау человека антителам или их связывающим фрагментам, которые можно создавать в качестве альтернативы гуманизации. Например, в данной области известны трансгенные животные (например, мыши), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие образования эндогенных мышечных антител. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединительной области тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и герминативных мутантных мышей ведет к полному ингибированию образования эндогенных антител. Перенос массива генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким герминативным мутантным мышам ведет к образованию антител человека со специфичностью к конкретному антигену после иммунизации трансгенного животного, несущего гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека, указанным антигеном. Технологии получения таких трансгенных животных и технологии выделения и продуцирования антител человека у таких трансгенных животных известны в данной области (Lonberg, 2005; Green, 1999; Kellermann and Green, 2002; Nicholson et al., 1999). Альтернативно, у трансгенного животного, например мыши, только гены иммуноглобулинов, кодирующие переменные области антитела мыши, заменяют на соответствующие последовательности переменных генов иммуноглобулинов человека. Гены иммуноглобулинов зародышевой линии мыши, кодирующие константные области антител, остаются без изменений. Таким образом, эффекторные

функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, развитие В-клеток, по существу, не изменены, что может вести к усовершенствованному образованию антител после антигенного стимула *in vivo*. Когда гены, кодирующие конкретное антитело, представляющее интерес, выделены у таких трансгенных животных, гены, кодирующие константные области, можно заменять на гены константных областей человека для того, чтобы получать полностью человеческое антитело. Другие способы получения фрагментов антител из антител человека *in vitro* основаны на технологиях дисплеев, таких как технология фагового дисплея или рибосомного дисплея, в которых используют библиотеки рекомбинантных ДНК, которые создают, по меньшей мере, отчасти искусственно или из донорских репертуаров генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов. Технологии фаговых и рибосомных дисплеев для создания антител человека хорошо известны в данной области (Winter et al., 1994; Hoogenboom, 2002; Kretzschmar and von Ruden, 2002; Groves and Osbourn, 2005; Dufner et al., 2006).

Антитела человека также можно создавать из выделенных В-клеток человека, которые иммунизируют *ex vivo* антигеном, представляющим интерес, и впоследствии сливают для того, чтобы создавать гибридомы, для которых затем можно осуществлять скрининг оптимального антитела человека (Grasso et al., 2004; Li et al., 2006).

Термин "нейтрализующее Тау-связывающее антитело", как используют в настоящем описании, относится к антителу, которое связывается с и ингибирует по меньшей мере одну биологическую активность Тау. В конкретном варианте осуществления "нейтрализующее Тау-связывающее антитело", как используют в настоящем описании, относится к антителу, которое связывает Тау и ингибирует его агрегирование в анализе *in vitro*, таком как, например, анализ *in vitro*, как описано далее в эксперименте 3.1.

Термин "антитело", как используют в настоящем описании, в целом относится к интактным (целым, полноразмерным) антителам, т.е. содержащим элементы двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Антитело может содержать другие дополнительные связывающие домены, например молекулу DVD-Ig, как раскрыто в WO 2007/024715, или так называемое (FabFv)₂Fc, описанное в WO 2011/030107. Таким образом, антитело, как используют в настоящем описании, включает би-, три- или тетравалентные полноразмерные антитела.

Связывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (т.е. полноразмерные тяжелые цепи и легкие цепи); Fab, модифицированные Fab, Fab', модифицированные Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-scFv, Fab-scFc, Fab-scFv, стабилизированные дисульфидными мостиками, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, scFv-scFc, dsscFv, dsscFv-scFc, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетраатела, доменные антитела (dAb), такие как sdAb, фрагменты VHH и VNAR и эпитопсвязывающие фрагменты любого указанного выше (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Формат Fab-Fv впервые раскрыт в WO 2009/040562, а его версии, стабилизированные дисульфидными мостиками, Fab-dsFv, впервые раскрыты в WO 2010/035012. Форма Fab-scFv, стабилизированная дисульфидными мостиками, описана в WO 2013/068571. Форматы антител, включая форматы scFc, впервые описаны в WO 2008/012543. Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

Поливалентные антитела могут содержать несколько специфичностей, например могут быть биспецифическими или могут быть моноспецифическими (см., например, WO 92/22583 и WO 05/113605). Один такой пример последнего представляет собой Tri-Fab (или TFM), как описано в WO 92/22583.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен фрагмент Fab.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен фрагмент Fab'.

Типичная молекула Fab' содержит пару из тяжелой и легкой цепей, в которой тяжелая цепь содержит переменную область VH, константный домен CH1 и природную или модифицированную шарнирную область, а легкая цепь содержит переменную область VL и константный домен CL.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен димер Fab' в соответствии с настоящим раскрытием, чтобы создавать F(ab')₂, например, димеризация может происходить через шарнир.

В одном из вариантов осуществления антитело или его связывающий фрагмент содержит связывающий домен. Связывающий домен в целом должен содержать 6 CDR, три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. В одном из вариантов осуществления CDR находятся в каркасе и вместе формируют переменную область. Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитело или связывающий фрагмент содержит связывающий домен со специфичностью к антигену, содержащий переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи.

Следует принимать во внимание, что аффинность Тау-связывающих антител или их связывающих фрагментов, предусмотренных настоящим раскрытием, можно изменять с использованием подходящих известных в данной области способов. Настоящее раскрытие, следовательно, также относится к вариантам молекул антител по настоящему изобретению, которые обладают усовершенствованной аффинностью к Тау. Такие варианты можно получать с помощью множества протоколов созревания аффинности,

включая введение мутаций в CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование штаммов-мутаторов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и ПЦР с имитацией полового размножения (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (выше) рассматривают эти способы созревания аффинности.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, таким образом, также могут охватывать какие-либо, например, из приведенных выше конкретно отмеченных аминокислотных последовательностей легких или тяжелых цепей с одной или несколькими консервативными заменами (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 консервативными заменами). Можно определять положения в аминокислотной последовательности, которые являются кандидатами на консервативные замены, и можно выбирать синтетические и встречающиеся в природе аминокислоты, которые обеспечивают консервативные замены для каких-либо конкретных аминокислот. Соображения для выбора консервативных замен включают контекст, в котором выполняются какую-либо конкретную замену аминокислоты, гидрофобность или полярность боковой цепи, общий размер боковой цепи, и значение pK боковых цепей с кислой или основной характеристикой при физиологических условиях. Например, лизин, аргинин и гистидин часто подходящим образом заменяют друг друга. Как известно в данной области, это обусловлено тем, что все три аминокислоты имеют основные боковые цепи, тогда как значение pK для боковых цепей лизина и аргинина значительно ближе друг к другу (приблизительно 10 и 12), чем к гистидину (приблизительно 6). Аналогичным образом, глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин часто подходящим образом заменяют друг друга при условии, что глицин часто не подходит для замены других элементов группы. Другие группы аминокислот, часто подходящим образом заменяющих друг друга, включают, но не ограничиваясь этим, группу, состоящую из глутаминовой и аспарагиновой кислот; группу, состоящую из фенилаланина, тирозина и триптофана; и группу, состоящую из серина, треонина и, необязательно, тирозина.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, как они упомянуты в контексте настоящего изобретения, могут охватывать производные образцовых антител, фрагментов и последовательностей, описанных в настоящем описании. "Производные" включают Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, которые химически модифицированы. Примеры химической модификации включают ковалентное прикрепление одного или нескольких полимеров, таких как водорастворимые полимеры, N-связанные или O-связанные углеводы, сахара, фосфаты и/или другие такие молекулы, такие как поддающиеся обнаружению метки, такие как флуорофоры.

При желании, Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования в настоящем изобретении, таким образом, можно конъюгировать с одной или несколькими эффекторными молекулами. Следует принимать во внимание, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или больше таких молекул, связанных так, чтобы формировать единую часть, которую можно прикреплять к антителам по настоящему изобретению. Когда желательно получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, его можно получать посредством стандартных химических процедур или процедур с рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связывают, непосредственно или через связывающее средство, с эффекторной молекулой. Способы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2-е изд., Robinson et al., ред., 1987, с. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Эти способы конъюгирования эффекторных молекул могут включать сайт-специфическую конъюгацию или не сайт-специфическую или случайную конъюгацию. Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторной молекулой является белок или полипептид, связь можно создавать с использованием процедур с рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745. Альтернативно, конкретный участок прикрепления эффекторной молекулы можно конструировать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по изобретению, например, как описано в WO 2008/038024. Кроме того, связывающее средство можно использовать для того, чтобы соединять эффекторную молекулу с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению, например, как описано в WO 2005/113605. Специалисту в данной области будет понятно, что приведенные выше возможности можно использовать самостоятельно или в комбинации.

Термин "эффекторная молекула", как используют в настоящем описании, включает, например, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другое антитело или фрагменты антител, синтетические или встречающиеся в природе полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоактивный йодид, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения, или соединения, которые можно обнаруживать посредством ЯМР- или ЭПР-спектроскопии. Эффекторная молекула, как используют в настоящем описании, также включает терапевтические средства, такие как химиотерапевтические средства, терапевтические полипептиды, наночастицы, липосомы

или терапевтические нуклеиновые кислоты.

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 ; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь этим, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Ферменты, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Белки, полипептиды и пептиды, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботическое средство или антиангиогенное средство, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологической реакции, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста, и иммуноглобулины или другие соединения белков или полипептидов, содержащие больше чем 10 аминокислот, которые основаны на белковых каркасах, например, из липокалина ("антикалина"), фибронектина ("аднектины", тринектины), доменов Кунитца, лектина С-типа, трансферрина, гамма-кристаллина, цистеиновых узлов, анкириновых повторов ("DARPin"), доменов Fyn SH3 ("финомеры") или белка А ("афитела"), как известно в данной области (Tomlinson, 2004; Mosavi et al., 2004; Gill and Damle, 2006; Nilsson and Tolmachev, 2007; Binz et al., 2004; Silacci et al. 2014).

Другие эффекторные молекулы включают пептиды и белки, которые усиливают или облегчают проникновение через гематоэнцефалитический барьер. Например, в WO 2010/043047, WO 2010/063122, WO 2010/063123 или WO 2011/041897 описаны пептиды или полипептиды, которые могут действовать в качестве вектора, способного транспортировать терапевтическую молекулу через гематоэнцефалитический барьер, и способ их конъюгации с терапевтической молекулой. Пептиды и белки, представляющие интерес в контексте проникновения через гематоэнцефалитический барьер включают, но не ограничиваясь этим, пептиды и белки, которые связываются с рецептором гематоэнцефалитического барьера, таким как рецептор трансферрина, рецептор глюкозы, рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста, белок 8, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности, белок 1, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности, и фактор роста, подобный гепаринсвязывающему эпидермальному фактору роста. Альтернативно эффекторная молекула представляет собой фрагмент антитела, такого как доменное антитело, антитело верблюдовых или производное антитела акулы (VNAR), который специфически связывается с одним из вышеуказанных рецепторов гематоэнцефалитического барьера.

Другие эффекторные молекулы могут включать поддающиеся обнаружению вещества, которые можно использовать, например, при диагностике. Примеры поддающихся обнаружению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, металлы, испускающие позитроны, такие как те, которые можно использовать в позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. В целом, ионы металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств, см. в патенте США № 4741900. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{68}Ga и ^{18}F . Эффекторные молекулы конкретных типов, подходящие в качестве поддающихся обнаружению веществ, которые можно использовать для диагностики, включают электронодефицитные тетразины и транциклооктен (ТСО), как описано в Wyffels et al. 2014, *Nuclear Medicine and biology* 41 (2014):513-523, где Тау-связывающее антитело по изобретению, соединенное с тетразином, можно вводить и позволять ему достигать максимального захвата и достаточного выведения из нецелевых мест, после чего следует последующее введение ТСО или оптимизированного аналога ТСО, меченного подходящим радиоактивным нуклидом, так, что ТСО будет ковалентно связывать тетразин на Тау-связывающем антителе по изобретению и допускать свое обнаружение, например, посредством позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен Тау-связывающий Fab, Fab' или scFv, связанный с радиоактивным нуклидом или тетразином. Связи с радиоактивным нуклидом или тетразином можно создавать через присоединение через какую-либо доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенной во фрагменте антитела, например лю-

бую свободную amino-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться в природе во фрагменте антитела, или их можно конструировать во фрагменте с использованием способов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из примеров Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab фрагмент, в котором модификация представляет собой добавление на С-конец его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для того, чтобы сделать возможным присоединение эффекторной молекулы. Подходящим образом, дополнительные аминокислоты формируют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым можно прикреплять эффекторную молекулу. В одном из вариантов осуществления, если радионуклид представляет собой ион металла, такого как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{64}Cu или ^{68}Ga , его можно связывать с помощью макроциклического хелатора, например, как описано Turner et al. (Br. J. Cancer, 1994, 70:35-41; Comparative biodistribution of indium-III-labelled macrocycle chimeric B72.3 antibody conjugates in tumour-bearing mice), в соответствии с чем последний, в свою очередь, ковалентно связывают с указанной выше боковой цепью аминокислоты или функциональной группой или группами концевой аминокислоты антитела или фрагмента антитела. В дополнительном варианте осуществления последний макроциклический хелатный комплекс со связанным радионуклидом может представлять собой эффекторную молекулу, описанную в WO 05/113605, которая представляет собой часть шивателя, который сшивает два или больше антител против Тау или их фрагментов.

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo*, и/или снижать иммуногенность антитела, и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин и альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как те, которые описаны в WO 05/117984.

Когда такая эффекторная молекула представляет собой полимер, она может, в целом, представлять собой синтетический или встречающийся в природе полимер, например, необязательно замещенный полиалкилен с неразветвленной или разветвленной цепью, полиалкениленовый или полиоксиалкениленовый полимер или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо- или гетерополисахарид.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный с неразветвленной или разветвленной цепью поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль) поли(виниловый спирт) или их производные, в частности необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные встречающиеся в природе полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном из вариантов осуществления эффекторная молекула представляет собой альбумин или его фрагмент, например сывороточный альбумин человека или его фрагмент.

Размер полимера можно варьировать по желанию, но в целом он находится в диапазоне усредненных молекулярных масс от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, таком как от 20000 до 40000 Да. Размер полимера можно выбирать конкретно, исходя из предполагаемого использования продукта, например, способности к локализации в определенных тканях, таких как головной мозг, или к увеличению времени полужизни в циркуляции (обзор см. в Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Таким образом, например, где продукт предназначен для того, чтобы покинуть циркуляцию и проникать в ткань.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, в частности, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и, в частности, с молекулярной массой в диапазоне приблизительно от 15000 до 40000 Да.

В одном из примеров антитела для использования в настоящем изобретении прикрепляют к фрагментам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). В одном конкретном примере антитело представляет собой Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, и ПЭГ молекулы можно прикреплять через какую-либо доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенную во фрагменте антитела, например, какую-либо свободную amino-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться естественным образом во фрагменте антитела, или их можно конструировать во фрагменте с использованием способов рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из примеров Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой модифицированный фрагмент Fab, в котором модификация представляет собой добавление на С-конец его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот для того, чтобы сделать возможным присоединение эффекторной молекулы. Подходящим образом, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым можно присоединять эффекторную молекулу. Можно использовать несколько участков для присоединения двух или больше молекул ПЭГ.

Подходящим образом молекулы ПЭГ ковалентно связывают через тиоловую группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. Каждую молекулу полимера, присоединенную к модифицированному фрагменту антитела, можно ковалентно связывать с атомом серы остатка цистеина, расположенного во фрагменте. Ковалентная связь обычно представляет собой дисульфидную связь или, в частности, связь сера-углерод. Когда тиоловую группу используют в качестве точки присоединения, можно использовать надлежащим образом активированные эффекторные молекулы, например, селективные тиоловые производные, такие как малеимиды, и цистеиновые производные. Активированный полимер можно использовать в качестве исходного материала при получении модифицированных полимером фрагментов антител, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой какой-либо полимер, содержащий тиоловую реакционноспособную группу, такую как α -галогенокарбоновая кислота или сложный эфир, например йодацетамид, имид, например малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы можно получать коммерчески (например, в Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или можно получать из коммерчески доступных исходных материалов с использованием стандартных химических процедур. Конкретные молекулы ПЭГ включают 20К метокси-ПЭГ-амин (возможно получение в Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (возможно получение в Nektar, ранее Shearwater).

В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие их вариабельные легкие и/или тяжелые цепи, и молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR1, CDR2 и/или CDR3 их вариабельных легких и/или тяжелых цепей.

В качестве примера VL AB1 (SEQ ID NO: 7) можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 26). VH AB1 (SEQ ID NO: 8) можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 27).

Гуманизованную VL SEQ ID NO: 11 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 30. Гуманизованную VL SEQ ID NO: 12 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 31. Гуманизованную VH SEQ ID NO: 14 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 32 и гуманизованную VH SEQ ID NO: 15 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 33.

Гуманизованную легкую цепь SEQ ID NO: 17 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 34. Гуманизованную легкую цепь SEQ ID NO: 18 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 35. Гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 36 и гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 37. Гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 23 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 38 и гуманизованную тяжелую цепь SEQ ID NO: 24 можно кодировать с помощью SEQ ID NO: 39.

Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты можно кодировать с помощью одной нуклеиновой кислоты (например, одной нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды легкой и тяжелой цепей антитела), или с помощью двух или больше отдельных нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует отличающуюся часть антитела или фрагмента антитела. В связи с этим раскрытие предусматривает одну или несколько нуклеиновых кислот, которые кодируют какое-либо из вышеуказанных антител или связывающих фрагментов. Молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК и т.п.

Например, последовательности ДНК, кодирующие частично или полностью тяжелую и легкую цепи антитела, можно синтезировать по желанию из определенных последовательностей ДНК или на основании соответствующих аминокислотных последовательностей. ДНК, кодирующие акцепторные каркасные последовательности, широко доступны специалистам в данной области и могут быть легко синтезированы на основании их известных аминокислотных последовательностей.

Стандартные способы молекулярной биологии можно использовать для того, чтобы получать последовательности ДНК, кодирующие молекулу антитела по настоящему изобретению. Желаемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично, используя способы синтеза олигонуклеотидов. Способы сайт-специфического мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать в зависимости от ситуации.

Предпочтительно кодирующие последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны с последовательностями, управляющими экспрессией, которые делают возможной экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия указанного полинуклеотида включает транскрипцию полинуклеотида в транскрибируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в данной области. Обычно они содержат регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции, и необязательно сигналы поли-А, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать энхансеры транскрипции и трансляции и/или естественным образом ассоциированные или гетерологичные промоторные области.

Настоящее раскрытие в дополнительном аспекте, таким образом, предусматривает клонирующие

или экспрессирующие векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты.

"Вектор" представляет собой какую-либо молекулу или композицию, которая обладает способностью переносить последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина, где может иметь место, например, синтез кодируемого полипептида. Обычно и предпочтительно вектор представляет собой нуклеиновую кислоту, которая сконструирована с использованием способов рекомбинантной ДНК, которые известны в данной области для встраивания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновую кислоту по изобретению). Экспрессирующие векторы обычно содержат один или несколько из следующих компонентов (если они уже не предусмотрены в молекуле нуклеиновой кислоты): промотор, одна или несколько энхансерных последовательностей, участок начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полная интронная последовательность, содержащая донорный и акцепторный сайт сплайсинга, лидерная последовательность для секреции, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, область полилинкера для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подлежащий экспрессии, и элемент селективного маркера.

Обычно выбирают векторы, функциональные в клетке-хозяине, в которой вектор будут использовать (вектор совместим с аппаратом клетки-хозяина так, что может происходить амплификация гена и/или экспрессия гена).

Настоящее раскрытие в дополнительном аспекте, таким образом, предусматривает клетки-хозяева, содержащие клонирующие или экспрессирующие векторы, как описано выше, и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Тау-связывающие антитела и их связывающие фрагменты, как описано выше.

Клетка-хозяин может представлять собой клетку любого типа, способную к трансформации нуклеиновой кислотой или вектором с тем, чтобы продуцировать Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, кодируемые ими. Клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор, можно использовать для продуцирования Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента или его части (например, последовательности тяжелой цепи или последовательности легкой цепи, кодируемой нуклеиновой кислотой или вектором). После введения нуклеиновой кислоты или вектора в клетку, клетку культивируют в условиях, подходящих для экспрессии кодируемой последовательности. Затем антитело, антигенсвязывающий фрагмент или часть антитела можно выделять из клетки.

Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки-хозяева (такие как *E. coli*) или эукариотические клетки-хозяева (такие как клетки дрожжей, клетки насекомого или клетки позвоночного). Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях экспрессирует антитело или его связывающий фрагмент, которые впоследствии можно собирать из среды для культивирования (если клетка-хозяин секретирует их в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей их (если они не секретируются). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые желательны или необходимы для активности, такие как гликозилирование или фосфорилирование, и легкость укладки в биологически активную молекулу. Выбор клетки-хозяина зависит отчасти от того, подлежит ли антитело или его связывающий фрагмент посттранскрипционной модификации (например, гликозилированию и/или фосфорилированию). Если так, клетки-хозяева дрожжей, насекомых или млекопитающих являются предпочтительными.

Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают CHO, миеломные или гибридные клетки. Клетки яичника китайского хомяка (CHO) подходящих типов для использования в настоящем изобретении могут включать клетки CHO и CHO-K1, включая клетки CHO dhfr-, такие как клетки CHO-DG44 и клетки CHODXB11, и те, которые можно использовать с селективным маркером DHFR, или клетки CHOKI-SV, которые можно использовать с селективным маркером глутаминсинтетазой. Многие доступны в American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. Примеры включают клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) (ATCC № CCL61), клетки эмбриональной почки человека (HEK) 293 или 293T (ATCC № CRL1573), клетки 3T3 (ATCC № CCL92) или клетки PER.C6. Клетки других типов, используемые при экспрессии антител, включают лимфоцитарные клеточные линии, например, миеломные клетки NSO и клетки SP2, клетки COS.

Другой аспект настоящего раскрытия предусматривает процесс продуцирования Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей, например, вектор, в условиях, подходящих для того, чтобы приводить к экспрессии Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, например, с ДНК, кодирующей Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, и выделение молекулы антитела.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае только последовательность, кодирующая полипептид тяжелой цепи или легкой цепи, подлежит использованию для трансфекции клеток-хозяев. Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами, первый вектор кодирует полипептид легкой цепи и второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, можно использовать один вектор, вектор содержит последовательности, кодирую-

щие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент антитела и фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием экспрессируют на хорошем уровне в клетках-хозяевах. Таким образом, свойства антител и/или фрагментов способствуют коммерческой обработке.

Таким образом, предусмотрен процесс культивирования клетки-хозяина и экспрессии Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, выделения последних и необязательной их очистки для предоставления выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента. В одном из вариантов осуществления процесс дополнительно включает стадию конъюгации эффекторной молекулы с выделенным антителом или фрагментом, например конъюгации с полимером ПЭГ, в частности, как раскрыто в настоящем описании.

Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно составлять в композициях, в частности фармацевтических или диагностических композициях. Фармацевтические композиции содержат терапевтически или профилактически эффективное количество Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в смеси с подходящим носителем, например фармацевтически приемлемым средством. Диагностические композиции содержат диагностически эффективное количество Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента в смеси с подходящим носителем, например диагностически приемлемым средством.

Фармацевтически приемлемые средства для использования в данных фармацевтических композициях включают носители, эксципиенты, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красящие, ароматизирующие и разбавляющие средства, эмульгирующие средства, суспендирующие средства, растворители, наполнители, объемобразующие средства, буферы, носители для доставки, регулирующие тоничность средства, соразтворители, смачивающие средства, комплексообразующие средства, буферные средства, противомикробные и поверхностно-активные средства.

Композиция может быть в жидкой форме или в лиофилизированной форме и может содержать один или несколько лиопротекторов, эксципиентов, поверхностно-активных средств, высокомолекулярных структурных добавок и/или объемобразующих средств (см., например, патенты США 6685940, 6566329 и 6372716).

Композиции могут подходить для парентерального введения. Образцовые композиции подходят для инъекции или инфузии животному посредством какого-либо пути, доступного квалифицированному работнику, такого как внутрисуставной, подкожный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, интрацеребральный (интрапаренхимальный), интрацеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный путь или внутрь повреждения. Парентеральный состав обычно представляет собой стерильный не содержащий пирогены изотонический водный раствор, необязательно содержащий фармацевтически приемлемые консерванты.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактатный раствор Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают восполнители текучих и питательных веществ, восполнители электролитов, такие как те, которые основаны на декстрозе Рингера, и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, например, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т.п. (см. в целом, Remington's Pharmaceutical Science, 16-е изд., ред. Mack, 1980, которое включено в настоящее описание посредством ссылки).

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять для контролируемой или замедленной доставки таким образом, который обеспечивает локальную концентрацию продукта (например, болус, эффект депо) и/или увеличенную стабильность или время полужизни в конкретном локальном окружении. Композиции могут включать состав антител, связывающих фрагментов, нуклеиновых кислот или векторов по изобретению с препаратами частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д., а также средствами, такими как биоразрушаемая матрица, инъеклируемые микросферы, микрокапсульные частицы, микрокапсулы, биоразрушаемые гранулы, липосомы и имплантируемые устройства доставки, которые обеспечивают контролируемое или замедленное высвобождение активного средства, которое тогда можно доставлять в виде инъекции депо.

Альтернативно или дополнительно композиции можно вводить локально через имплантацию в пораженную область мембраны, губки или другого подходящего материала, в котором абсорбировано или инкапсулировано антитело, связывающий фрагмент, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению. Когда используют имплантируемое устройство, устройство можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, и доставка антитела, связывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению может происходить непосредственно через устройство через болус, или через непрерывное введение, или через катетер с использованием непрерывной инфузии.

Фармацевтическую композицию, содержащую Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, можно составлять для ингаляции, например, в виде сухого порошка. Ингаляционные растворы

также можно составлять в сжиженном пропелленте для аэрозольной доставки. В другом составе растворы можно доставлять с помощью небулайзера.

Один аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в качестве терапевтически активного средства при лечении заболеваний.

Другой аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов при лечении таупатий. Таупатии, которые по описаниям содержат Тау-включения (Clavaguera et al. Brain Pathology 23 (2013) 342-349), включают болезнь Альцгеймера (AD); амиотрофический боковой склероз/комплекс паркинсонизм-деменция; болезнь аргирофильных зерен; хроническую травматическую энцефалопатию; кортикобазальную дегенерацию; диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией; синдром Дауна; семейную британскую деменцию; семейную датскую деменцию; лобно-височную деменцию и паркинсонизм, сцепленный с хромосомой 17, обусловленный мутациями MAPT; болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера; гваделупский паркинсонизм; миотоническую дистрофию; нейродегенерацию с накоплением железа в головном мозге; болезнь Ниманна-Пика, тип С; негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками; болезнь Пика; постэнцефалитический паркинсонизм; прионную церебральную амилоидную ангиопатию; прогрессирующий подкорковый глиоз; прогрессирующий надъядерный паралич (PSP); умственную отсталость, связанную с SLC9A6; подострый склерозирующий панэнцефалит; деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков и таупатию белого вещества с глобулярными глиальными включениями.

Другой аспект настоящего раскрытия, таким образом, относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов при лечении болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

Соответственно настоящее раскрытие также относится к способам лечения таупатий, в частности, болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича, посредством введения терапевтически активного количества Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящее раскрытие также относится к использованию Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента при изготовлении лекарственного средства для лечения таупатий, в частности, болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

В другом аспекте настоящего раскрытия Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно использовать отдельно или в комбинации с другими средствами в терапии. Например, Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент можно совместно вводить по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. В определенных аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, эффективное для лечения другого нарушения или того же, для лечения которого используют Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент. Образцовые дополнительные терапевтические средства включают, но не ограничиваясь этим: ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты рецепторов NMDA (такие как мемантин), ингибиторы агрегирования бета-амилоидных пептидов, антиоксиданты, модуляторы γ -секретазы, имитаторы фактора роста нервов (NGF) или генная терапия NGF, агонисты PPAR γ , ингибиторы HMS- CoA редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецепторов GABA, ингибиторы киназы гликогенсинтазы, внутривенный иммуноглобулин, агонисты мускариновых рецепторов, модуляторы никотиновых рецепторов, активную или пассивную иммунизацию бета-амилоидным пептидом, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецепторов серотонина и антитела против бета-амилоидного пептида или дополнительные антитела против Тау. Дополнительные образцовые неврологические лекарственные средства можно выбирать из гормона роста или нейротрофического фактора; примеры включают, но не ограничиваясь этим, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-4/5, фактор роста фибробластов (FGF)-2 и другие FGF, нейротрофин (NT)-3, эритропоэтин (EPO), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF)- α , TGF- β , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротурин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), херегулин, нейрегулин, артемин, персефин, интерлейкины, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GFR), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (CSF), гранулоцитарно-макрофагальный CSF, нетрины, кардиотрофин-1, хеджехог, ингибирующий лейкемию фактор (LIF), мидкин, плейотрофин, морфогенетические белки кости (BMP), нетрины, сапонины, семафорины и фактор стволовых клеток (SCF). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство выбирают по его способности смягчать один или несколько побочных эффектов неврологического лекарственного средства. Такие способы комбинированного лечения, отмеченные выше, охватывают комбинированное введение (когда два или больше терапевтических средств включены в один и тот же или отдельные составы) и отдельное введение, в случае которого введение Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адьюванта. Тау-

связывающие антитела или их связывающие фрагменты также можно использовать в комбинации с другой интервенционной терапией, такой как, но не ограничиваясь этим, лучевая терапия, поведенческая терапия или другая терапия, известная в данной области и подходящая для неврологического нарушения, подлежащего лечению или предотвращению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в качестве диагностически активного средства.

Один аспект настоящего раскрытия также относится к использованию Тау-связывающих антител и их связывающих фрагментов в диагностике таупатий, в частности, болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича.

Такое диагностическое тестирование предпочтительно можно выполнять на биологических образцах. "Биологический образец" охватывает образцы различных типов, получаемые от индивидуума, которые можно использовать в диагностическом или мониторинговом анализе. Определение охватывает цереброспинальную жидкость, кровь и другие образцы жидкостей биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие как биоптаты или тканевые культуры или клетки, получаемые из них, и их потомство. Определение также включает образцы, которыми манипулировали каким-либо образом после их получения, например, посредством обработки реактивами, солиubilизации или обогащения определенными компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин "биологический образец" охватывает клинический образец и также включает клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и тканевые образцы. Термин "биологический образец" включает мочу, слюну, цереброспинальную жидкость, фракции крови, такие как плазма и сыворотка, и т.п.

Диагностическое тестирование предпочтительно можно выполнять на биологических образцах, которые не находятся в контакте с организмом человека или животного. Такое диагностическое тестирование также обозначают как тестирование *in vitro*.

Диагностическое тестирование *in vitro* может быть основано на способе обнаружения Тау *in vitro* в биологическом образце, полученном у индивидуума, который включает стадии i) контакта биологического образца с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом, как раскрыто в настоящем описании; и ii) обнаружение связывания Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, как раскрыто в настоящем описании, с Тау. Посредством сравнения обнаруживаемого уровня Тау с подходящим контролем, затем можно диагностировать присутствие или вероятность возникновения таупатии, такой как болезнь Альцгеймера и/или прогрессирующий надъядерный паралич. Такой способ обнаружения, таким образом, можно использовать для того, чтобы определять, имеет ли субъект таупатию или ли риск ее развития, включая определение стадии (тяжести) таупатии.

Настоящее раскрытие, таким образом, предусматривает способ диагностирования таупатии *in vitro*, например, болезни Альцгеймера и/или прогрессирующего надъядерного паралича, у субъекта, включающий стадии i) оценки уровня или состояния Тау в биологическом образце, полученном у субъекта, посредством использования Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента, как раскрыто в настоящем описании; и ii) сравнения уровня или состояния Тау с эталонным, стандартным или нормальным контрольным значением, которое отражает уровень или состояние Тау у нормальных контрольных субъектов. Значимое различие между уровнем и/или состоянием полипептида Тау в биологическом образце и нормальным контрольным значением указывает на то, что индивидуум имеет таупатию, такую как болезнь Альцгеймера и/или прогрессирующий надъядерный паралич.

В отношении эти различных аспектов и вариантов осуществления, которые описаны в настоящем описании, настоящее раскрытие предусматривает, в частности:

1. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит
 - вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или
 - вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5 или последовательностей, по меньшей мере на 90% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6 или последовательностей, по меньшей мере на 0% идентичных ей.
2. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит
 - вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3; и
 - вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 4, CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 5, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 6.
3. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X₁ в SEQ ID NO: 3 представляет собой A.
4. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2,

в котором X_1 в SEQ ID NO: 3 представляет собой G.

5. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_2 в SEQ ID NO: 6 представляет собой A.

6. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_2 в SEQ ID NO: 6 представляет собой Q.

7. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_2 в SEQ ID NO: 6 представляет собой N.

8. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_2 в SEQ ID NO: 6 представляет собой D.

9. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором X_2 в SEQ ID NO: 6 представляет собой S.

10. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

11. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 10, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело.

12. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 11, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело субтипа IgG1 или IgG4.

13. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау в пределах аминокислот 197-206 из SEQ ID NO: 55

14. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

15. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

16. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 7, и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 8.

17. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой A.

18. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_1 в SEQ ID NO: 7 представляет собой Q.

19. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_2 в SEQ ID NO: 8 представляет собой A.

20. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_2 в SEQ ID NO: 8 представляет собой Q.

21. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_2 в SEQ ID NO: 8 представляет собой N.

22. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_2 в SEQ ID NO: 8 представляет собой D.

23. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором X_2 в SEQ ID NO: 8 представляет собой S.

24. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 15-22 или 23, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

25. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 24, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное антитело.

26. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 15-24 или 25, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау в пределах аминокислот с 197 до 206 в SEQ ID NO: 55.

27. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 15-25 или 26, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

28. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 9 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 10 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

29. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 13 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей, и/или

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 16 или последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные ей.

30. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 13, и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 16.

31. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_1 в SEQ ID NO: 13 представляет собой A.

32. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_1 в SEQ ID NO: 13 представляет собой G.

33. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_2 в SEQ ID NO: 16 представляет собой A.

34. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_2 в SEQ ID NO: 16 представляет собой Q.

35. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_2 в SEQ ID NO: 16 представляет собой N.

36. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_2 в SEQ ID NO: 16 представляет собой D.

37. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, в котором X_2 в SEQ ID NO: 16 представляет собой S.

38. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или 15.

39. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 29, в котором вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 11 или 12.

40. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 29-38 или 39, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

41. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 40, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело.

42. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 41, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент относится к субтипу IgG1 или IgG4.

43. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 29-41 или 42, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау в пределах аминокислот 197-206 из SEQ ID NO: 55.

44. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 29-42 или 43, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

45. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит

легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей, и/или

тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22 или последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные ей.

46. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 19, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 22.
47. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_1 в SEQ ID NO: 19 представляет собой А.
48. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_1 в SEQ ID NO: 19 представляет собой G.
49. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_2 в SEQ ID NO: 22 представляет собой А.
50. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_2 в SEQ ID NO: 22 представляет собой Q.
51. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_2 в SEQ ID NO: 22 представляет собой N.
52. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_2 в SEQ ID NO: 22 представляет собой D.
53. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45 или 46, в котором X_2 в SEQ ID NO: 22 представляет собой S.
54. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45, в котором переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или 15.
55. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 45, в котором переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 11 или 12.
56. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 45-54 или 55, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное гуманизованное антитело.
57. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 56, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент относится к субтипу IgG1 или IgG4.
58. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 45-56 или 57, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау, находящейся в пределах аминокислот 197-206 из SEQ ID NO: 55.
59. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 45-57 или 58, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.
60. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау, находящейся в пределах аминокислот 197-206 из SEQ ID NO: 55.
61. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 60, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.
62. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 60 или 61, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизованное или полностью человеческое антитело.
63. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 62, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное гуманизованное антитело или его связывающий фрагмент субтипа IgG1 или IgG4.
64. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 60, 61, 62 или 63, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.
65. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или его связывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-63 или 64.
66. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 65, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент конкурирует за связывание с Тау с Тау-связывающим антителом или связывающим фрагментом, содержащим переменную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 11 или 12, и

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 14 или 15.

67. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается, по существу, с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-66 или 67.

68. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 67, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается, по существу, с тем же эпитопом Тау, что и Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область легкой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 11 или 12, и вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит SEQ ID NO: 14 или 15.

69. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 65, 66, 67 или 68, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело.

70. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 69, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело.

71. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по варианту осуществления 70, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело субтипа IgG1 или IgG4.

72. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 65-70 или 71, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент связывается с фосфорилированной областью Тау аминокислоты 197-206 из SEQ ID NO: 55.

73. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 65-71 или 72, где указанное Тау-связывающее антитело или связывающий фрагмент связывается с растворимыми формами Тау человека, парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека или как с растворимыми формами Тау человека, так и с парными спиральными филаментами (PHF) Тау человека.

74. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-72 или 73, где указанное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv, scFv, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab-dsFv, Fab-scFc, scFv-scFc, dsScFv, dsScFv-scFc, диатело, триатело, тетратело, линейное антитело или VHH-содержащее антитело.

75. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую и/или тяжелую цепь Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74.

76. Клонированный или экспрессируемый вектор, содержащий одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 75.

77. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 75 или один или несколько клонируемых или экспрессируемых векторов по варианту осуществления 76.

78. Клетка-хозяин по варианту осуществления 77, которая не является эмбриональной стволовой клеткой человека.

79. Способ получения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74, включающий по меньшей мере стадии

а) культивирования клетки-хозяина по варианту осуществления 77 или 78, и

б) выделение указанного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента.

80. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74 для применения в качестве терапевтически активного средства.

81. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74 для использования в лечении таупатии.

82. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 81, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

83. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 81, где указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

84. Способ лечения таупатии, включающий стадию введения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74 нуждающемуся в этом субъекту.

85. Способ по варианту осуществления 84, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

86. Способ по варианту осуществления 85, где указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

87. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариан-

тов осуществления 1-73 или 74 для применения в качестве диагностического средства.

88. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-73 или 74 для использования в диагностировании таупатии.

89. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 88, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

90. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент для использования по варианту осуществления 88, где указанная таупатия представляет собой прогрессирующий надъядерный паралич.

Изобретение далее описано в отношении некоторых примеров, которые, однако, не следует толковать в качестве ограничения.

Эксперименты.

Эксперимент 1. Создание Тау-связывающих антител.

1.1 Конструирование и получение пептида Тау.

Пептиды и иммуногены получали из Peptide Protein Research Ltd., Bishop's Waltham, U.K. и синтезировали посредством Fmoc твердофазного синтеза пептидов в соответствии со способом Atherton и Sheppard. (Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, England: IRL Press). Пептиды, содержащие фосфосерин (pSer), фосфотреонин (pThr), 3-нитротирозин (nTyr) и N-ε-ацетил лизин (aLys), синтезировали с использованием Fmoc-защищенных предшественников Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH, Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH, Fmoc-Tyr(3-NO₂)-OH и Fmoc-Lys (Ac)-OH.

Конструировали и использовали пептид для получения Тау-связывающих антител, которые будут распознавать все изоформы Тау с посттрансляционными модификациями фосфосерином (pSer), фосфотреонином (pThr) и/или нитрозотирозин (nTyr); он представляет остатки с 197 до 206 при выравнивании с изоформой 2 Тау (SEQ ID NO: 55, код Uniprot:P10636-8, номер доступа NCBI: NP_005901.2):

N-ацетил-nTyr pSer pSer Pro Cys* pSer Pro Gly pThr Pro-амид (пептид обозначают как T197, он определен в SEQ ID NO: 56).

N- и C-концы пептида блокировали ацетильными и амидными группами соответственно, cys* обозначает, что тиоловая группа боковой цепи цистеина является точкой конъюгации для образования связи с белком-переносчиком или биотином для получения иммуногенов или реактива для анализа соответственно, как подробно изложено далее. Реактив для анализа для мониторинга титров антител получали посредством реакции равных масс малеимида-ПЭГ-биотина и пептида. Три различных иммуногена получали посредством реакции пептида со следующими белками-переносчиками, которые замещали малеимидными группами по ε-амино боковых цепей лизина: гемоцианин фисурелловый (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) и овальбумин (OVA).

1.2 Иммунизация.

Двух самок новозеландских кроликов-альбиносов (>2 кг) иммунизировали подкожно с использованием 500 мкг общей смеси пептидов (T197 и T211), эмульсифицированной в равном объеме полного адьюванта Фрейнда (CFA) посредством энергичного перемешивания с использованием шприца. Конструировали пептиды, конъюгированные с KLH, OVA и BSA, и поочередно проводили иммунизацию. Кролики получали 2 инъекции реиммунизации с интервалами 21 сутки, используя неполный адьювант Фрейнда (IFA), брали образцы крови из уха через 14 суток после иммунизации. Завершение наступало на 14 сутки после последней реиммунизации с получением суспензий отдельных клеток селезенки, костного мозга и мононуклеарных клеток периферической крови, которые замораживали в 10% DMSO/FCS при -80°C.

1.3. Культура В-клеток.

Культуры В-клеток получали с использованием способа, схожего с тем, который описан Zubler et al. (1985). В кратком изложении В-клетки, полученные из РВМС иммунизированных кроликов, культивировали при плотности приблизительно 3000 клеток на лунку в 96-луночных тканевых культуральных планшетах со штриховыми кодами в 200 мкл/лунка среды RPMI 1640 (Gibco BRL) с добавлением 10% FCS (PAA laboratories ltd), 2% HEPES (Sigma Aldrich), 1% L-глутамин (Gibco BRL), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco BRL), 0,1% β-меркаптоэтанола (Gibco BRL), 3% супернатанта культуры активированных спленоцитов и гамма-облученных мутантных клеток EL4 тимомы мыши (5×10⁴/лунка) в течение семи суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Брали образец приблизительно всего 1,2×10⁷ В-клеток.

1.4. Первичный скрининг.

Присутствие антител, специфичных к пептиду T197, в супернатантах культуры В-клеток определяли с использованием анализа связывания на основе гомогенной флуоресценции с использованием гранул Superavidin™ (Bangs Laboratories), покрытых биотинилированным пептидом T197 в качестве источника целевого антигена. Скрининг включал перенос 10 мкл супернатанта из 96-луночных тканевых культуральных планшетов со штриховыми кодами в 384-луночные аналитические планшеты с черными стенками и штриховыми кодами, содержащими T197, иммобилизованный на гранулах (10 мкл/лунка), используя жидкостный манипулятор Matrix Platemate. Связывание обнаруживали с использованием конъю-

гата козы со специфичностью к Fc γ IgG кролика и Cy5 (Jackson). Планшеты считывали на системе обнаружения клеток Applied Biosystems 8200.

1.5. Вторичный скрининг.

После первичного скрининга положительные супернатанты объединяли в 96-луночных мастер-планшетах со штриховыми кодами, используя робот для точечного переноса Aviso Onyx, и В-клетки в планшетах для клеточных культур замораживали при -80°C . Затем осуществляли скрининг мастер-планшетов в анализе ELISA на пептиде T197 и также только на стрептавидине. Это выполняли для того, чтобы определять пептидную специфичность для каждой лунки и исключать ложные положительные лунки, показывающие неспецифическое связывание с гранулами Superavidin. Анализ ELISA включал захват биотинилированного T197 в 384-луночных планшетах Maxisorp (ThermoScientific/Nunc), покрытых стрептавидином, в карбонатном покрывающем буфере ($\text{dH}_2\text{O}+0,16\% \text{Na}_2\text{CO}_3+0,3\% \text{NaHCO}_3$). Планшеты блокировали с использованием 1% мас./об. ПЭГ/PBS и затем инкубировали с 10 мкл/лунка супернатанта культуры В-клеток (разведенного 1:1 блокирующим буфером). В планшеты добавляли вторичное конъюгированное с HRP антитело козы против Fc IgG кролика (Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch), после чего следовала визуализация связывания с использованием субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, из EMD Millipore; 10 мкл/лунка). Оптическую плотность измеряли на 630 нм с использованием считывателя микропланшетов BioTek Synergy 2. В первичном анализе связывания идентифицировали 880 попаданий и после скрининга ELISA, для 406 из них показано специфическое связывание с T197. Супернатанты В-клеток, демонстрирующие специфичность к T197, отбирали для дальнейшего анализа посредством Viacore для того, чтобы идентифицировать те, которые обладают наилучшей аффинностью.

1.6. Получение варибельной области.

Для того чтобы сделать возможным получение генов варибельной области антитела на основании отбора лунок, представляющих интерес, стадия деконволюции подлежала осуществлению, чтобы сделать возможной идентификацию антиген-специфических В-клеток в данной лунке, которая содержала гетерогенную популяцию В-клеток. Этого достигали с использованием способа флуоресцентного фокуса (Clargo et al., 2014). В кратком изложении секретирующие иммуноглобулины В-клетки из положительной лунки смешивали со стрептавидиновыми гранулами (New England Biolabs), покрытыми биотинилированным пептидом T197, и 1:1200 конечным разведением FITC-конъюгата антитела козы, специфичного к фрагменту Fc γ кролика (Jackson). После статичной инкубации при 37°C в течение 1 ч антиген-специфические В-клетки можно идентифицировать благодаря присутствию флуоресцентного гало, окружающего эту В-клетку. Затем определенное число этих индивидуальных клонов В-клеток, идентифицированных с использованием микроскопа Olympus, брали микроманипулятором Eppendorf и помещали в пробирку для ПЦР.

Гены варибельной области антитела извлекали из отдельных клеток посредством ПЦР с обратной транскрипцией (RT), используя специфические праймеры для варибельных областей тяжелой и легкой цепей. Два раунда ПЦР осуществляли на жидкостном роботизированном манипуляторе Aviso Onyx со вложенной 2° ПЦР, включающей участки рестрикции на 3'- и 5'-концах, которая делает возможным клонирование варибельной области в экспрессирующий вектор млекопитающих для IgG (VH) кролика или каппа (VL) кролика. Гены антител против T197 из 31 различной лунки успешно клонировали в экспрессирующие векторы. Конструкции тяжелых и легких цепей совместно трансфицировали в клетки HEK-293 с использованием Fectin 293 (Invitrogen) и рекомбинантное антитело экспрессировали в 125 мл колбе Эрленмейера в объеме 30 мл. После 5-7 суток экспрессии супернатанты собирали и очищали с использованием аффинной хроматографии.

Эксперимент 2. Дополнительный скрининг идентифицированных антител.

2.1. Получение Tau в E. coli.

Гены, кодирующие различные изоформы Tau, создавали синтетически с оптимизацией кодонов для экспрессии в E. coli. Стандартные способы молекулярной биологии использовали для субклонирования в модифицированный вектор pET32, сконструированный для получения Tau с N-концевой меткой 6His-TEV.

Клетки E. coli BL 21 (DE3) трансформировали вышеуказанным вектором и белок экспрессировали с использованием стандартных способов.

Затем клетки E. coli извлекали посредством центрифугирования, лизировали и захватывали белок Tau из растворимой фракции посредством аффинной хроматографии с использованием NiNTA (Qiagen). Метку 6His удаляли с использованием TEV протеазы, после чего следовала вторая стадия NiNTA хроматографии. В очищенном Tau проводили замену буфера с использованием подходящих буферов в зависимости от применения. В образцах, созданных для иммунизации, удаляли эндотоксин с использованием колонок Proteus NoEndoTM (Vivaproducts).

Создание изотопически меченого Tau для исследований ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Экспрессию белка осуществляли, как описано выше, за исключением того, что минимальные среды использовали для встраивания ^{15}N , ^{13}C и ^2H в белок. Осадки клеток E. coli лизировали и очищали белок

Тау с использованием стадии NiNTA (Qiagen) аффинной хроматографии, удаляли метку 6His с использованием TEV протеазы и затем белок Тау очищали посредством гель-фильтрации с использованием блока Superdex 200 (GE-Healthcare).

2.2. Получение Тау в HEK293.

Гены, кодирующие изоформу 2 Тау, создавали синтетически с использованием последовательности ДНК дикого типа. Стандартные способы молекулярной биологии использовали для ее субклонирования в экспрессирующий вектор pMV-10HisTEV (содержащей промотор CMV), сконструированный для получения Тау с N-концевой меткой 10His-TEV.

Получаемый вектор трансфицировали с использованием экспрессирующей системы Expi293TM (Invitrogen) по протоколам производителя. В этой системе используют клетки Expi293F человека, полученные из клеточной линии HEK293.

Белок Тау накапливали в средах для культивирования, откуда его извлекали с использованием Ni Sepharose Excel (GE Healthcare) для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла. Затем метку 10His удаляли с использованием TEV протеазы перед повторным внесением в колонку с Ni Sepharose и собирали отщепленный Тау из протекающей жидкости. В очищенном Тау проводили замену буфера на подходящие буферы в зависимости от применения.

2.3. Получение PHF фибрилл Тау из образцов головного мозга человека.

Белок Тау парных спиральных филаментов (PHF) очищали от образцов головного мозга от доногов с болезнью Альцгеймера (AD), или прогрессирующим надъядерным параличом (PSP), или лобно-височной деменцией (FTD) в соответствии с протоколом, опубликованным посредством Ksiezak-Reding и Wall (Neurobiology of Aging 15, 11-19, 1994). Фракции 8 (эквивалентна неочищенному PHF-Тау перед центрифугированием в градиенте сахарозы в этом источнике) и 11 (эквивалентна фракции A2, SDS-растворимому PHF, как описано в этом источнике), которые ранее описаны как обогащенные PHF-Тау, извлекали и использовали для анализа ВΙΑсоге и клеточного анализа в эксперименте 3.

2.4 Скрининг ELISA.

Затем очищенное антитело подвергали дополнительному скринингу с помощью ELISA и Вiasоге для того, чтобы подтвердить активность рекомбинантного антитела и выбирать наивысшую аффинность и наиболее специфическое антитело. Анализ ELISA также включал захват биотинилированного T197 на 384-луночных планшетах Maxisorp (ThermoScientific/Nunc), покрытых стрептавидином в карбонатном покрывающем буфере ($\text{dH}_2\text{O}+0,16\% \text{Na}_2\text{CO}_3+0,3\% \text{NaHCO}_3$). Отдельные планшеты также покрывали различными пептидами Тау для картирования альтернативных областей молекулы Тау, чтобы проверить специфичность связывания только с последовательностью T197. Планшеты блокировали с использованием 1% мас./об. ПЭГ/PBS и затем инкубировали с несколькими разведениями очищенного временного супернатанта. В планшеты добавляли вторичное HRP-конъюгированное антитело козы против Fc IgG кролика (Stratech Scientific Ltd/Jackson ImmunoResearch), после чего следовала визуализация связывания с субстратом TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, из EMD Millipore; 10 мкл/луночка). Оптическую плотность измеряли на 630 нм, используя считыватель микропланшетов BioTek Synergy 2. Данные для отобранного антитела, AB1 с VL кролика SEQ ID NO: 7 и VH кролика SEQ ID NO: 8, представлены на фиг. 1. Как можно видеть, AB1 демонстрирует высокоизбирательное связывание только с T197, но не с четырьмя пептидами, соответствующими другим областям молекулы Тау:

T174 N-ацетил-C*K pT PPAK pT PP амид (SEQ ID NO:62);

T211 N-ацетил- R pT P pS L P pT P C* амид (SEQ ID NO:63);

T230 N-ацетил-R pT P P K pS P pS SC* амид (SEQ ID NO: 57) и

T396 N-ацетил-C*pS P V V pS G D pT pS амид (SEQ ID NO:64);

* - положение конъюгации с биотином.

2.5. Скрининг ВΙΑсоге.

Отобранные клоны антитела IgG кролика против Тау временно экспрессировали, очищали и анализировали с использованием платформы SPR Вiasоге T200. Антитела сначала захватывали на сенсорном чипе CM5, используя реактив, иммобилизованный F(ab')_2 , козы против Fc γ кролика. Проточные кюветы 2, 3 и 4 демонстрировали уровни иммобилизации 5600-6100 RU, тогда как блокированная проточная кювета 1 (только декстран) служила в качестве эталона. Очищенные IgG разводили до 0,5 мкг/мл в буфере HBS-EP+из GE Healthcare и захватывали чипом при скорости потока 10 мкл/мин. За каждой стадией захвата следовали 180 с инъекции анализируемого вещества с комплексом пептида/стрептавидина, буферными контролями и комплексом дефосфорилированного пептида/стрептавидина. Пептиды дефосфорилировали с использованием 10 мкл 100 мкМ раствора пептида в HBS-EP+, содержащего 3 мМ EDTA и 1% DMSO, разводя его 1:10 в буфере HBS-N (GE Healthcare), содержащем 0,3 мМ EDTA, и насыщая EDTA с использованием 2 мкл 0,5М MgCl_2 . 2 мкл разведения 1:10 (в HBS-N) щелочной фосфатазы кишечника теленка (NEB, № по каталогу M0290S) добавляли и инкубировали при 37°C в течение одного часа, затем хранили при 4°C. Фосфатазную реакцию ингибировали посредством добавления 1 мкл 0,5М EDTA в смесь. Раствор использовали для получения комплекса дефосфорилированного пептида/стрептавидина. В качестве отрицательного контроля для антитела кролика с областью VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8 использовали пептид T230 из области Тау 230-238 с аминокислотной последова-

тельностью SEQ ID NO: 57. Данные аппроксимировали по модели двухвалентного анализируемого вещества.

В табл. 1 представлены значения аффинности, измеряемые для этого антитела при связывании с комплексами фосфорилированных и дефосфорилированных пептидов T197 и T230/стрептавидина.

Таблица 1

Пептид Тау	Связывание (RU)	Ka (1/мс)	Kd (1/м)	KD (нМ)
T197	61	9,2E+05	2,6E-03	3
T197 дефос.	1	Значимое связывание отсутствует		
T230	0	Значимое связывание отсутствует		
T230 дефос.	0	Значимое связывание отсутствует		

Отобранные моноклональные Fab фрагменты (mFab) получали из мурализированного антитела mAB1c легкой цепью SEQ ID NO: 58 и тяжелой цепью SEQ ID NO: 59, используя набор для расщепления Pierce Ficin (№ по каталогу 44980, Thermo Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Абсорбцию при 280 нм использовали для того, чтобы определять концентрацию стоковых растворов Fab для анализа Biacore. Осуществляли аминную иммобилизацию препарата нерастворимого белка Тау от пациентов с болезнью Альцгеймера (AD-PHF, фракция 11), мономеров изоформы 2 Тау, полученной из НЕК, (аминокислоты 1-441) и мономеров изоформы 2, экспрессируемой в *E. coli*, на чипе CM5 и измеряли связывание mFab против Тау с использованием прибора Biacore T200. Буфер HBS-EP из GE Healthcare использовали для иммобилизации, помимо AD-PHF, для которых использовали 10 мМ уксусную кислоту (рН 3,0). В буфер HBS-EP+добавляли 300 мМ NaCl и 1,25% CM-Dextran (Sigma) и использовали в качестве буфера для анализа. Используя проточную кювету (Fc) 1 в качестве эталона, следующие значения RU получали для Fc2-4: 44 RU с использованием 5 мкг/мл *E. coli* Тау, 56 RU с использованием 5 мкг/м НЕК Тау и 500 RU с использованием разведенного 1:20 раствора материала AD-PHF. Для регенерации использовали два цикла по 60 с в 10 мМ глицине (рН 1,7). Скорости потока 10 мкл/мин использовали для иммобилизации и регенерации, а скорость потока 30 мкл/мин использовали для связывания анализируемого вещества. Для AD-PHF применяли множество инъекций вручную для достижения 500 RU, включая экпирование EDC/NHS и EtoA. Применяли пять стартовых циклов и 12 циклов на образец mFab или буферный контроль, используя инъекции анализируемого вещества 90 мкл в течение 180 или 300 с для диссоциации. 11 разведений 1:3 раствора 600 нМ плюс буфер использовали для каждого mFab.

Таблица 2

Связывание mFab из mAB1 и контрольного антитела 101.4 с мономерной изоформой 2 Тау, экспрессируемой в *E. coli*, клетках НЕК293 млекопитающего и выделенных PHF фибриллах Тау от пациентов с болезнью Альцгеймера

Образец		Rmax (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M) *
101.4 (изотипический контроль)	<i>E. coli</i> iso-2	Значимое связывание отсутствует			
	НЕК iso-2	Значимое связывание отсутствует			
	AD-PHF	Значимое связывание отсутствует			
mAB1	<i>E. coli</i> iso-2	Значимое связывание отсутствует			
	НЕК iso-2	Значимое связывание отсутствует			
	AD-PHF	5	7,96E+04	4,70E-02	5,90E-07

2.6. Картирование эпитопов посредством BIAcore.

Осуществляли аминную иммобилизацию мономера рекомбинантной изоформы 2 Тау (аминокислоты 1-441), экспрессированного клетками НЕК и очищенного от них, и нерастворимого белка Тау в форме препарата парных спиральных филаментов, выделенного из головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (AD-PHF), на чипе CM5 с использованием прибора Biacore 3000 и HBS-EP (GE Healthcare) в качестве подвижного буфера. Для первых осуществляли связывание аминов с проточными кюветами 2 и 4 соответственно после активации поверхности карбоксиметилдекстрана этих и эталонных проточных кювет посредством инъекции 70 мкл свежей смеси 50 мМ N-гидроксисукцимида и 200 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида при скорости потока 10 мкл/мин. Иммобилизации мономера Тау достигали посредством инъекции 160 мкл в концентрации 50 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере рН 5,0, тогда как AD-PHF иммобилизовали посредством инъекции двадцати 160 мкл аликвот с концентрацией 2 мкг/мл в 10 мМ уксусной кислоте (рН 3,0). Поверхности тестовых и контрольных проточных кювет дезактивировали с использованием 50 мкл импульса 1 М этаноламина-HCl рН 8,5.

Картирование эпитопов осуществляли посредством предварительной инкубации растворов Тау-связывающего гуманизированного антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 (L17H20), и тестового пептида или буферных контролей, полученных в подвижном буфере с 200 и 5000 нМ соответственно. Их тестировали отдельно в серии сенсографических циклов при постоянной скорости потока 10 мкл/мин посредством инъекции 50 мкл относительно эталона, проточных кювет мономера Тау и AD-PHF. Единицы ответа связывания антитела регистрировали в отчетные моменты,

наступающие через 15 с после окончания каждой инъекции, в виде разности между значениями тестовых и эталонных проточных кювет. Чип регенерировали в конце каждого цикла посредством двух 20 мкл инъекций 1,5 М гуанидина в фосфатно-солевом буфере.

Таблица 3

Пептид	Последовательность Тау										% ингибирования	
	Идентификатор	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	HEK iso-2
T197	nY	pS	pS	P	G	pS	P	G	pT	P	54	100
T197B	Y	S	S	P	G	S	P	G	T	P	н. з.	н. з.
T197C	Y	pS	pS	P	G	pS	P	G	pT	P	49	101
T197E	nY	pS	S	P	G	pS	P	G	pT	P	52	102
T197F	nY	pS	pS	P	G	S	P	G	pT	P	30	36
T197G	nY	pS	pS	P	G	pS	P	G	T	P	н. з.	н. з.
T197H	nY	pS	pS	P	G						н. з.	н. з.
T197I					G	pS	P	G	pT	P	55	101

Легенда: nY представляет собой нитротирозин;

pS представляет собой фосфосерин;

pT представляет собой фосфотреонин;

н. з. не значимо по уровню доверия 95%.

Реакционную способность антитела в отношении данного тестового пептида подтверждали уровнем процентной доли ингибирования связывания антитела с иммобилизованным мономером Тау или с AD-PHF относительно такового для усредненного значения связывания антитела, вычисленного для контрольных циклов.

Тестовые пептиды получали и анализировали на основании пептида, содержащего остатки с 196 до 206 белка Тау (SEQ ID NO: 65), и роль посттрансляционной модификации фосфосерином, фосфотреонином и/или нитрозотирозином анализировали, как определено в табл. 3

На основании этого анализа сделано заключение о том, что минимальный эпитоп представляет собой фосфорилированную область Тау, определяемую аминокислотами с 201 до 206 в SEQ ID NO: 55, (соответствующими мотиву Gly pSer Pro Gly pThr Pro), а также, что этот эпитоп имеет абсолютное требование к присутствию фосфотреонина в положении 205 в SEQ ID NO: 55 и фосфосерина в положении 202 в SEQ ID NO: 55.

Эксперимент 3. Определение дополнительных характеристик идентифицированных антител.

3.1 Клеточный анализ.

Получение неочищенных растворимых и нерастворимых фракций от трансгенных мышей с Тау, чтобы индуцировать агрегирование Тау.

Для этих экспериментов использовали трансгенных мышей, экспрессирующих Тау человека P301S (Allen et al., 2002 J. Neurosci.22(21):9340-51 и P301L (Lewis et al., 2000 Nat Genet. (4):402-5; Götz J, et al., 2001 J Biol Chem. 276 (1):529-34).

Неочищенные растворимые и нерастворимые фракции получали из головного мозга трансгенных мышей с Тау P301S и P301L посредством дифференциального центрифугирования. В кратком изложении ткани головного мозга трансгенных мышей с Тау P301S (спинной мозг и ствол головного мозга) и P301L (средний мозг и ствол головного мозга) гомогенизировали в ледяном TBS (Fisher Scientific) с использованием ручного гомогенизатора Pellet Pestle Motor (Kontes) в 1,5 мл микропробирках для центрифуги на льду. Затем гомогенаты (H) центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при 4°C для того, чтобы удалить тканевую дебрис. Получаемые супернатанты (S0) центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°C, чтобы предоставлять супернатанты, соответствующие неочищенной растворимой фракции (S1). Остающиеся пеллеты (P1) ресуспендировали в 1 мл 1%-го раствора саркозила, полученного в TBS, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч при 4°C. Супернатанты (S2) выбрасывали. Пеллеты (P2) промывали в 5 мл ледяного TBS и затем ресуспендировали в TBS, чтобы предоставлять неочищенную нерастворимую фракцию (P2').

Получение клеток HEK-293-F, экспрессирующих Тау человека с мутацией P301S.

Клетки HEK-293-F (Life Technologies) трансфицировали вектором pcDNA3.1(+), экспрессирующим изоформу 2 Тау человека с мутацией P301S, используя 293fectin (Life Technologies) по инструкциям производителя. Аликвоты трансфицированных клеток хранили в жидком азоте.

Индукция агрегирования Тау.

На фиг. 2 проиллюстрированы различные стадии анализа агрегирования клеток, используемого для определения характеристик активности терапевтических антител к Тау. В сутки 1 клетки HEK-293-F,

экспрессирующие изоформу 2 Тау человека с мутацией P301S (P301S-Tau), размораживали при 37°C и разбавляли с использованием 293 Expression medium (Life Technologies), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку и 1% пенициллин-стрептомицин (FFBS). Клетки считали, используя автоматический счетчик клеток (Vi-CELL XR, Beckman Coulter), и затем высевали в предварительно покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One) при плотности 25000 живых клеток на лунку. Клетки поддерживали при 37°C в 5% CO₂. В те же сутки обработанный звуком нерастворимый Тау человека от пациентов с болезнью Альцгеймера (AD-PHF, фракция 8), или прогрессирующим надъядерным параличом (PSP-PHF, фракция 8), или лобно-височной деменцией (FTD-PHF), или из фракций головного мозга из головного мозга трансгенных мышей с P301S или P301L (используемых качестве затравок для того, чтобы индуцировать агрегирование Тау), инкубировали с антителами против Тау или без них в среде FFBS при 4°C и легком перемешивании в течение ночи. Фракцию 8 AD-PHF использовали по 80 и 60 нг/мкл для образцов AD и PSP соответственно; растворимую фракцию головного мозга от трансгенных мышей с P301S и P301L использовали по 0,1 и 1,2 мкг/мкл соответственно. В сутки 2 затравки или смеси затравок/антител наносили на клетки на 24 ч. В сутки 3 среду для культивирования заменяли на свежую среду FFBS, содержащую антитело, и клетки поддерживали в культуре в течение дополнительных 24 ч. В сутки 4 агрегирование Тау измеряли с использованием набора для анализа агрегирования Тау (Cisbio) на основании гомогенного переноса энергии флуоресценции с разрешением по времени (HTRF) по инструкциям производителя. Флуоресценцию измеряли с использованием SpectraMax Paradigm (Molecular Devices). Агрегирование приводили в виде процента агрегирования относительно контроля (-), который соответствует максимальной реакции агрегирования, индуцированной экзогенными фибриллами или фракциями в отсутствие антитела.

Тестировали эффект AB1 и других Тау-связывающих антител известного уровня техники, оказываемый на индуцированное агрегирование Тау. Антитела известного уровня техники представляют собой IPN002 из WO 2014/028777 A2, PT3 из WO 2013/096380 A2, mAb2.10.3 из WO 2010/142423 A2 и HJ8.5 из WO 2014/008404.

Результаты этого анализа сведены в табл. 3 и на фиг. 3.

В табл. 4 сведена активность (IC₅₀) и максимальный эффект (I_{max} при 300 нМ) AB1, содержащего мураинизированную VL SEQ ID NO: 9 и мураинизированную VH SEQ ID NO: 10 (VL9VH10), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 23 (L17H23), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 24 (L17H24), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 (L17H20), Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 (L17H21), и конкурентных антител против спектра Тау затравок из различных экстрактов головного мозга. При этом на фиг. 3 представлен эффект Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 (L17H20), и Тау-связывающего антитела, имеющего легкую цепь SEQ ID NO: 17 и тяжелую цепь SEQ ID NO: 21 (L17H21), в анализе агрегирования клеток с использованием патологических фибрилл Тау человека от людей-пациентов с PSP.

Таблица 4

Эксперимент 3.1					
mAb	Т/г мыши (P301S) IC ₅₀ /I _{max}	Т/г мыши (P301L) IC ₅₀ /I _{max}	Образцы людей с AD IC ₅₀ /I _{max}	Образцы людей с PSP IC ₅₀ : ND I _{max} : 54%	Образцы людей с FTD IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 81%
VL9VH10	IC ₅₀ : 8 нМ I _{max} : 62%	IC ₅₀ : 9 нМ I _{max} : 81%	IC ₅₀ : 10 нМ I _{max} : 79%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 54%	IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 81%
L17H23 IgG1	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	IC ₅₀ : ND I _{max} : 49%	Не тестировали
L17H24 IgG1	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	IC ₅₀ : ND I _{max} : 47%	Не тестировали
L17H20 IgG4	Не тестировали	Не тестировали	IC ₅₀ : 2 нМ I _{max} : 85%	IC ₅₀ : 42 нМ I _{max} : 65%	IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 79%
L17H21 IgG4	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	IC ₅₀ : 66 нМ I _{max} : 47%	Не тестировали
IPN002	IC ₅₀ : ND I _{max} : 22%	IC ₅₀ : 122 нМ I _{max} : 73%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 19%	IC ₅₀ : 207 нМ I _{max} : 64%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 50%
PT3	IC ₅₀ : 350 нМ I _{max} : 56%	IC ₅₀ : 26 нМ I _{max} : 69%	IC ₅₀ : 32 нМ I _{max} : 69%	IC ₅₀ : 47 нМ I _{max} : 55%	IC ₅₀ : 1 нМ I _{max} : 80%
mAb2.10.3	IC ₅₀ : ND I _{max} : 35%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 29%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 16%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 28% (*)	IC ₅₀ : ND I _{max} : 30%
AT8 (MN1020)	Не тестировали	Не тестировали	IC ₅₀ : ND I _{max} : 19%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 25%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 36%
HJ8.5	IC ₅₀ : ND I _{max} : 43%	Не тестировали	IC ₅₀ : ND I _{max} : 46%	IC ₅₀ : 73 нМ I _{max} : 79%	IC ₅₀ : ND I _{max} : 67%

ND - не определено;

(*) - максимальный эффект при 100 нМ.

Дополнительные эксперименты осуществляли в клеточном анализе для того, чтобы определять активность AB1, имеющего мураинизированную VL SEQ ID NO: 9 и мураинизированную VH SEQ ID NO: 10 (VL9VH10), используя затравку Tau от P301L (n=2), AD (n=3) и PSP (n=3), обеспечивая конечные значения IC₅₀ 15, 27 и 70 нМ соответственно; и значения I_{max} 79, 68 и 57% соответственно.

3.2 Гистологический анализ.

Анализировали AB1, имеющее VL кролика SEQ ID NO: 7 и VH кролика SEQ ID NO: 8, гуманизованное AB1, имеющее VL SEQ ID NO: 11 и VH SEQ ID NO: 14 (VL11VH14) или VL SEQ ID NO: 11 и VH SEQ ID NO: 15 (VL11VH15), и антитела IPN002, PT3 и Mab2.10.3 известного уровня техники и определяли оптимальные концентрации с использованием криосрезов гиппокампа человека от донора с болезнью Альцгеймера, у которого предварительно было показано наличие патологических Tau структур с использованием иммуноокрашивания AT8 (такого как описано в Braak & Braak, 1995, *Neurobiol Aging*; 16(3):271-8, и Porzig et al., 2007 *Biochem Biophys Res Commun*; 358(2):644-9). AB1 и все антитела известного уровня техники демонстрировали специфическую и зависящую от концентрации иммунореактивность, кроме 101.4 (отрицательное контрольное антитело). На основании этих данных выбирали одну оптимальную концентрацию антитела, которую использовали для скрининга панели из шести образцов головного мозга человека. Три образца происходили от доноров с болезнью Альцгеймера или от очень пожилых доноров, которые демонстрировали высокие уровни патологии Tau (положительную патологию Tau обнаруживали с использованием иммуноокрашивания AT8), и три от доноров без патологии Tau (отсутствие патологии Tau обнаруживали с использованием иммуноокрашивания AT8).

AB1, VL11VH14, VL11VH15, PT3 и Mab2.10.3 демонстрировали схожий паттерн иммуноокрашивания в AT8-положительных образцах. Специфическое иммуноокрашивание нейрофибриллярных клубков (интранейрональных NFT), цитоплазматического Tau, нейретических бляшковидных структур и нейропильных нитей наблюдали в гиппокампе и височной коре положительных по патологии Tau образцов. Однако значительно более слабое иммуноокрашивание обнаруживали в AT8-отрицательных тканях. Этот результат подсказывает, что эти антитела предпочтительно распознают патологический Tau по сравнению с непатологическим Tau.

IPN002 давало схожий сигнал как в положительных, так и в отрицательных по патологии Tau образцах.

3.3 Вестерн-блоттинг.

Вестерн-блоттинг выполняли с использованием хемилюминесцентного считывания: лизаты, полученные от людей с AD, PSP, загружали на 10% полиакриламидные гели (20 мкг белка на дорожку). Белки разделяли посредством SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и осуществляли их перенос на PVDF (поливинилиденфторидную) мембрану. Мембраны блокировали в 4% BSA (бычий сывороточный альбумин (в TBST: 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, pH корректировали с использованием HCl до pH 7,6). Мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом или не иммунным контрольным IgG антителом, промывали в TBST, инкубировали со вторичным антителом (мышь против биотина) в течение 1 ч, промывали в TBST, инкубировали с третичным антителом (против IgG мыши, с пероксидазой) в течение 1 ч, промывали в TBST и проявляли с использованием ECL (усиленная хемилюминесценция).

mAB1, имеющее мураинизированную VL SEQ ID NO: 9 и мураинизированную VH SEQ ID NO: 10, связывается с патологическим Tau из образцов от человека AD, но слабо с PSP (см. фиг. 4).

Эксперимент 4. Гуманизация идентифицированных антител.

AB1 с VL SEQ ID NO: 7 и VH SEQ ID NO: 8 гуманизовали посредством пересадки CDR из V-области антитела кролика в каркасы V-областей антитела человека эмбрионального типа. Для того чтобы восстанавливать активность антитела, в гуманизованной последовательности также сохраняли определенное число каркасных остатков из V-областей кролика. Эти остатки отбирали с использованием протокола, описанного Adair et al. (1991) (*Humanized antibodies*. WO 91/09967). Выравнивания последовательностей V-областей антитела (донорного) кролика с последовательностями V-областей зародышевой линии (акцепторными) человека представлены на фиг. 5 и 6 вместе со сконструированными гуманизованными последовательностями. CDR, которые пересаживали из донорной последовательности в акцепторную, определены у Kabat (Kabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, где используют комбинированное определение Chothia/Kabat (см. Adair et al., 1991 *Humanized antibodies*. WO 91/09967).

V-область человека IGKV1-39 плюс J-область JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) выбирали в качестве акцептора для CDR легких цепей антитела AB1. Все каркасные остатки легких цепей в графтах gL4 и gL9 из гена зародышевой линии человека. В CDRL3 вносили мутации в графте gL9 для того, чтобы модифицировать потенциальный участок дезамидирования. V-область IGHV4-39 человека плюс J-область JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) выбирали в качестве акцептора для CDR тяжелых цепей антитела AB1. Подобно многим антителам кролика ген VH антитела AB1 короче, чем выбранный акцептор человека. При выравнивании с акцепторной последовательностью человека каркасу 1 области VH антитела AB1 недостает N-концевого остатка, который сохраняется в гуманизованном антителе (фиг. 6). Каркасу 3 области VH AB1 кролика также недостает двух остатков (75 и 76) в петле между цепями D и E бета-складчатого слоя: в графтах gH41 и gH49 пропуск заполняют соответствующими остатками (лизин 75,

K75; аспарагин 76, N76) из выбранной акцепторной последовательности человека (фиг. 6). Все каркасные остатки тяжелой цепи в графтах gH41 и gH49 из гена зародышевой линии человека, за исключением одного или нескольких остатков из группы, содержащей остатки 71 и 78 (нумерация Kabat), где сохраняли донорные остатки лизин (K71) и валин (V78) соответственно. Сохранение остатков K71 и V78 важно для полной активности гуманизованного антитела. Остаток глутамина в положении 1 каркаса человека заменяли глутаминовой кислотой (E1), чтобы обеспечивать экспрессию и очистку гомогенного продукта: часто сообщается о превращении глутамина в пироглутамат на N-конце антител и фрагментов антител. В CDRH3 вносили мутации в графтах gH41 и gH49 для того, чтобы модифицировать потенциальный участок дезамидирования.

Гены, кодирующие множество вариантов последовательностей V-областей тяжелых и легких цепей для каждого антитела, разрабатывали и конструировали с помощью подхода автоматизированного синтеза в DNA2.0 Inc. Дополнительные варианты V-областей тяжелых и легких цепей создавали посредством модификации генов VH и VK с помощью направляемого олигонуклеотидами мутагенеза, включая, в некоторых случаях, мутации в CDR для того, чтобы модифицировать потенциальные участки дезамидирования. Для временной экспрессии гены гуманизованных V-областей легких цепей клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhCK для легких цепей человека, который содержит ДНК, кодирующую константную область капша цепи человека (аллотип Km3). Гены гуманизованных V-областей тяжелых цепей клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhγ4P FL для тяжелой цепи γ-4 человека, который содержит ДНК, кодирующую константную область тяжелой цепи γ-4 человека со стабилизирующей шарнир мутацией S241P (Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8). Альтернативно, гены гуманизованных VH клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhγ1FL тяжелой цепью γ-1, который содержит ДНК, кодирующую константную область γ-1 человека (аллотип G1m17.1). Для того чтобы оценивать кинетику одновалентного связывания гуманизованных антител, гены гуманизованных VH также клонировали в экспрессирующий вектор UCB pMhFab10HIS с Fab-HIS человека, который содержит ДНК, кодирующую шарнирный домен γ-1 CH1 человека с C-концевой меткой из 10 остатков гистидина: гистидиновая метка облегчает очистку экспрессируемых Fab посредством аффинной хроматографии. Совместной трансфекции получаемыми векторами тяжелых и легких цепей в суспензии клеток НЕК293 достигали с использованием 293fectin (12347-019 Invitrogen) и получали экспрессию гуманизованных, рекомбинантных антител в форматах IgG4P, IgG1 или Fab-HIS человека.

Цепи вариантов гуманизованных антител и их сочетания экспрессировали и оценивали по их активности относительно исходного антитела, их биофизическим свойствам и пригодности к последующей обработке.

Для стабильной экспрессии гуманизованных рекомбинантных антител в клетках млекопитающих ген гуманизованной V-области легкой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей константную область C-к человека (аллотип Km3), чтобы создавать непрерывный ген легкой цепи. Гены гуманизованных тяжелых цепей соединяли с ДНК, кодирующей или константную область тяжелой цепи γ-4P человек, или константную область тяжелой цепи γ-1 человека (аллотип G1m17.1), чтобы создавать непрерывные гены тяжелых цепей. Гены тяжелых и легких цепей клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, которое содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 2 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 3; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 6.

2. Выделенное Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, которое содержит легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 11 или 12 или последовательности, которые на 80% идентичны им, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 14 или 15.

3. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по п.1 или 2, где вариабельная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 и вариабельная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

4. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11 или 12.

5. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14 или 15.

6. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое представляет собой моноклональное гуманизованное антитело.

7. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент, полученное против эпитопа в пределах аминокислот 197-206 последовательности SEQ ID NO: 55.

8. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которое связы-

вается с фосфорилированной Тау-областью в пределах аминокислот 197-206 последовательности SEQ ID NO: 55.

9. Тау-связывающее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, которое связывается как с растворимым Тау-белком человека, со спаренными спиральными филаментами (PHF) Тау-белка человека или как с растворимым Тау-белком человека, так и со спаренными спиральными филаментами (PHF) Тау-белка человека.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8, 9.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая или тяжелую цепь Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8-10.

12. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновые последовательности по п.10 и 11.

13. Клетка-хозяин для получения антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8, 9, содержащая одну или несколько векторов экспрессии по п.12.

14. Способ получения Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или 8, 9, включающий, по меньшей мере, стадии:

с) культивирования клетки-хозяина по п.13 и

d) выделения указанного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента.

15. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 в качестве активного средства для лечения нейродегенеративного заболевания.

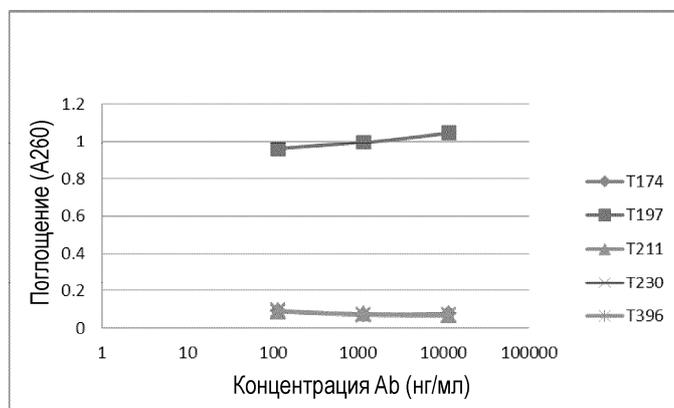
16. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для лечения таупатии.

17. Применение по п.16, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич.

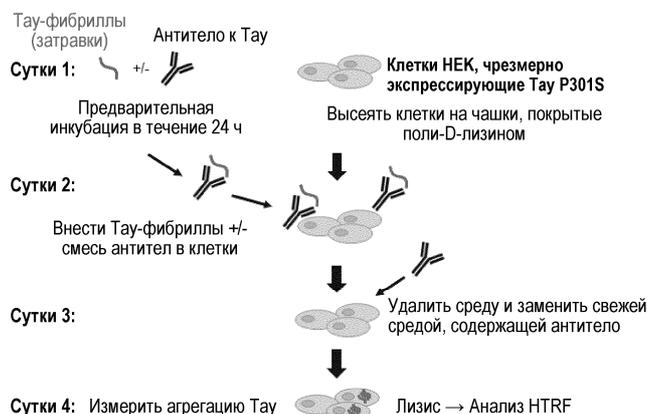
18. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 в качестве средства диагностики нейродегенеративного заболевания.

19. Применение выделенного Тау-связывающего антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для диагностики таупатии.

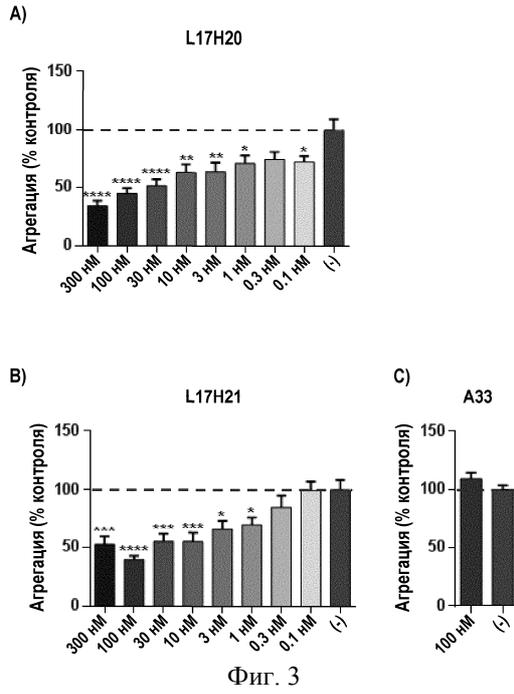
20. Применение по п.19, где указанная таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера или прогрессирующий надъядерный паралич.



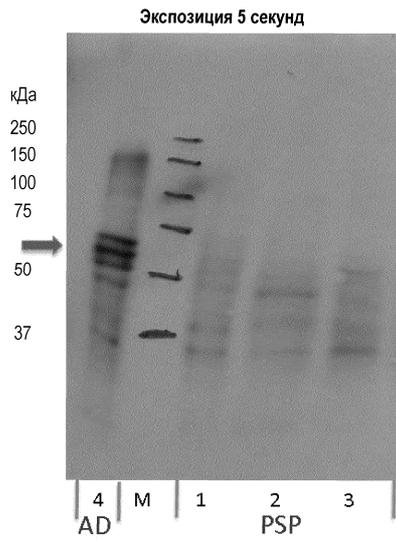
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

ТРАНСПЛАНТАТ В ЛЕГКОЙ ЦЕПИ АВ1

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95abc 100 105

A) AB1_VL

DVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKQASQSVSSYLAWYQQKPGQPPLLIYAASYLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQQGYTRTDIDNTFPGGGTKVUVE

B) IGKV1-39

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYST---PLTFGGGTKVEIK

C) gVL4_AB1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQSVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASYLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYTRTDIDNTFPGGGTKVEIK

D) gVL9_AB1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQSVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASYLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYTRTDIDNTFPGGGTKVEIK

Фиг. 5

ТРАНСПЛАНТАТ В ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ АВ1

1 5 10 15 20 25 30 ab 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 100abcd 105 110

A) VH_AB1
 -QSLLEESGGRLVTFGTRPLTLTCTVSG**IDLST--WRMN**WIRQPPGKGLEWIG**IIGTGGRTTYANWAKG**RFITISKSTST--TVDLKVTSPPTTEDTATYFCAR**LGANNNGYPLDL**WGPGLVTVSS

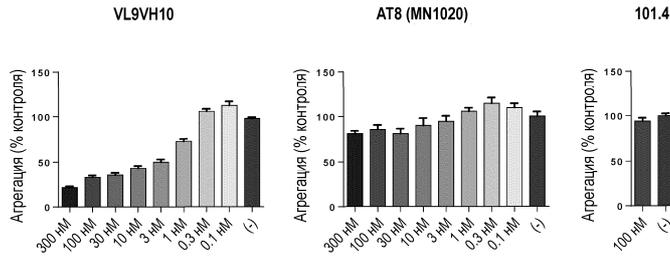
B)IGHV4-39
 QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG**GSISSSSYIYG**WIRQPPGKGLEWIG**SIYSGSTTYNPSLKS**RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----**YFDY**WGQGLVTVSS

C)
 gVH41_AB1
ELQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG**IDLST--WRMN**WIRQPPGKGLEWIG**IIGTGGRTTYANWAKG**RVITISK**K**DTSKNO**V**SLKLSVTAADTAVYYCAR**LGANNNGYPLDL**WGPGLVTVSS

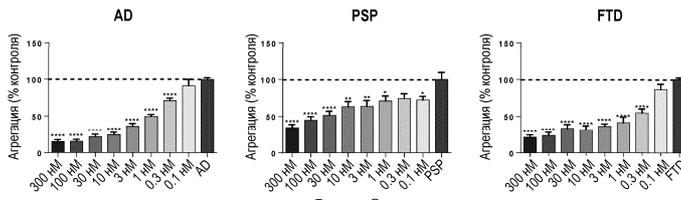
D) gVH49_AB1
ELQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSG**IDLST--WRMN**WIRQPPGKGLEWIG**IIGTGGRTTYANWAKG**RVITISK**K**DTSKNO**V**SLKLSVTAADTAVYYCAR**LGANNNGYPLDL**WGPGLVTVSS

N-концевой остаток глутамина заменяют на глутаминовую кислоту, это показано полужирным начертанием с выделением: E1

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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