

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992038** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.06

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(54) АНТИ-ПСФ-ТАУ-АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/472,214

(32) 2017.03.16

(33) US

(86) PCT/US2018/022782

(87) WO 2018/170351 2018.09.20

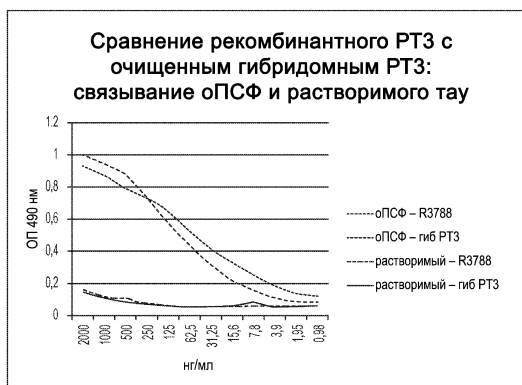
(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Меркен Марк (BE), Малиа Томас (US),
Боргерс Марианн, Ван Колен Кристоф (BE)**

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

(57) Описаны моноклональные анти-ПСФ-тау-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики состояний, таких как таупатии.



A1

201992038

201992038

A1

АНТИ-ПСФ-ТАУ-АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0002] Данное изобретение относится к анти-ПСФ-тау-антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены способы получения антител, способы применения антител для лечения патологических состояний, включая таупатию, и способы применения антител для диагностики таких заболеваний, как таупатии.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное нарушение мозговой деятельности, которое характеризуется в клиническом аспекте прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, логического мышления, здравого смысла и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому психическому распаду и, в конечном счете, к смерти. БА часто является причиной прогрессирующего слабоумия (деменции) у пожилых людей, это заболевание считается четвертой по распространенности причиной смерти от заболеваний в США. БА наблюдается в разных этнических группах по всему миру и представляет собой основную проблему общественного здоровья в настоящем и будущем.

[0004] Для головного мозга человека, страдающего БА, характерно поражение, именуемое сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. Большое количество таких очагов поражения, в частности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков парных спиральных филаментов, в целом обнаруживаются у пациентов с БА в нескольких областях головного мозга, отвечающих за память и когнитивную функцию.

[0005] Современная схема лечения БА включает только способы лечения, одобренные для лечения когнитивных симптомов у пациентов с деменцией. Не существует утвержденных способов лечения, которые изменяют или замедляют прогрессирование БА. Потенциальные модификаторы заболевания включают гуманизированное моноклональное антитело Соланезумаб к A_β (бета амилоиду) от Eli Lilly для пациентов с легкой формой БА и низкомолекулярный ингибитор BACE Верубецестат от Merck для пациентов с БА от

легкой до умеренной степени тяжести. Эти способы лечения и большинство других потенциальных модификаторов заболевания, которые могут появиться в следующем десятилетии, нацелены на A_β (основной компонент амилоидных бляшек, которые являются одним из двух «отличительных» патологических признаков БА).

[0006] Нейрофибриллярные клубки, являющиеся вторым признаком патологического признака БА, в основном состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Основной физиологической функцией тау является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау с микротрубочками происходит посредством ионных взаимодействий между положительными зарядами в области связывания микротрубочек в тау-белке и отрицательными зарядами на решетке микротрубочек (Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717–30, 1991). Тау-белок содержит 85 возможных сайтов фосфорилирования, и фосфорилирование во многих из этих сайтов нарушает основную функцию тау. Тау, который связан с решеткой аксонных микротрубочек, находится в состоянии гипофосфорилирования, в то время как агрегированный тау в БА является гиперфосфорилированным, обеспечивая уникальные эпитопы, которые отличаются от физиологически активного пула тау.

[0007] Описана гипотеза о передаче и распространении таупатии, которая основана на стадиях прогрессирования таупатии по Braak в головном мозге человека и распространении таупатии на доклинических моделях таупатии после введения агрегатов тау-белка (Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845–52, 2009; Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909–13, 2009).

[0008] Разработки лекарственных препаратов, предотвращающих или устраняющих агрегацию тау-белков вызывают большой интерес в течение многих лет, а потенциальные препараты, включая противоагрегационные соединения и ингибиторы киназ, допущены на стадию клинических исследований (Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783–93, 2009). Опубликованы многочисленные исследования, которые демонстрируют полезные терапевтические эффекты как активной, так и пассивной иммунизации тау на моделях трансгенных мышей (Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457–67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658–67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559–66, 2010; Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115–29, 2007). Сообщалось об активности как с фосфо-направленными, так и с нефосфо-направленными антителами

(Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016).

[0009] Несмотря на прогресс в данной области техники, остается потребность в эффективных терапевтических средствах, которые предотвращают агрегацию тау и прогрессирование таупатии, пригодных для лечения таупатий, таких как БА, и других нейродегенеративных заболеваний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Данное изобретение удовлетворяет эту потребность, предоставляя анти-ПСФ-тау-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют высокую аффинность связывания с тау-белками, имеющими парные спиральные филаменты (ПСФ), и являются селективными в отношении фосфорилированного тау. Антитела по данному изобретению были получены путем адаптации человеческого каркаса (НФА) ПСФ-тау-специфических антител мыши. Считается, что селективность антител к фосфорилированному тау учитывает эффективность против патогенного тау, не нарушая нормальную функцию тау. В данном изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения и применения антител. Анти-ПСФ-тау-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению ингибируют «семена» тау, что измеряют с помощью клеточных анализов с использованием семян тау, полученных из лизатов клеток НЕК (почки эмбриона человека) или из лизатов спинного мозга трансгенных мышей с мутантным тау. Кроме того, химерное антитело с переменными областями анти-ПСФ-тау-антитела по данному изобретению и константными областями Ig мыши, такими как константные области IgG2a мыши, блокировало активность образования «семян» в *in vivo* модели трансгенной мыши с мутантным тау.

[0011] Прогрессирование таупатии в головном мозге, пораженном БА, следует особым специфическим паттернам распространения. На доклинических моделях было показано, что внеклеточные «семена» фосфо-тау могут вызывать таупатию в нейронах (Clavaguera et al., *PNAS* 110(23):9535-40, 2013). Поэтому считается, что таупатия может распространяться прионоподобным образом из одной области мозга в другую. Этот процесс распространения будет включать в себя экстернализацию «семян» тау, которые могут быть поглощены соседними нейронами, и вызывать дальнейшую таупатию. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что анти-ПСФ-тау-антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению предотвращают агрегацию тау или распространение таупатии в мозге путем взаимодействия с «семенами» фосфо-тау.

[0012] В одном общем аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с ПСФ-тау белком. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

[0013] В соответствии с конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с фосфорилированным тау-белком на фосфорилированном эпитопе в богатом пролином домене тау-белка. В более конкретном аспекте фосфорилированный эпитоп содержит фосфорилированный T212 и/или фосфорилированный T217 тау-белка и фосфорилированный эпитоп, имеющий или находящийся в пределах любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 48, 52 и 54. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению связывается с фосфорилированным эпитопом, содержащим фосфорилированный T212 и фосфорилированный T217 тау-белка.

[0014] Согласно конкретному аспекту данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему:

(1) определяющие комплементарность тяжелой цепи иммуноглобулина области (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и определяющие комплементарность легкой цепи иммуноглобулина области (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно;

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно;

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно;

(5) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(6) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(7) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72 и 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(8) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(9) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(10) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(11) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

причем антители или его антигенсвязывающий фрагмент связывают ПФС-тау, предпочтительно ПФС-тау человека.

[0015] В более конкретном аспекте каркасные области в домене вариабельной области тяжелой цепи и в домене вариабельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности из иммуноглобулина человека.

[0016] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную любому

из SEQ ID NO: 26, 27, 28 и 29 или область V_H любой тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 74, 76 и 78, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 31, 32, 33 и 34 или область V_L любой легкой цепи из SEQ ID NO: 75, 77 и 79.

[0017] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную любому из SEQ ID NO: 45, 74, 76 и 78; и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 46, 75, 77 и 79.

[0018] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению дополнительно содержат константную область, такую как константная область тяжелой цепи IgG человека или мыши, и константную область легкой цепи каппа или лямбда антитела человека или мыши.

[0019] В другом общем аспекте данное изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

[0020] В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

[0021] В другом общем аспекте данное изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

[0022] В другом общем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу уменьшения патологической агрегации тау или распространения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[0024] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению. Таупатия включает, без ограничения, один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, деменции Пика, прогрессивного субкортикального глиоза, деменции с образованием только клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернистыми шарами, комплекса боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейцфельда-Якоба, множественной системной атрофии, липоидного гистиоцитоза типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с отложением прионного белка, подострого склерозирующего панэнцефалита, дистрофической миотонии, бокового амиотрофического склероза с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма и хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (кулачная болезнь).

[0025] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

[0026] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[0027] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу обнаружения присутствия фосфорилированного ПСФ-тау у субъекта или к способу диагностики таупатии у субъекта путем обнаружения присутствия ПСФ-тау у субъекта с использованием моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

[0028] Другие аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0029] Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми чертежами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0030] На **фиг. 1** показано связывание рекомбинантно экспрессированного РТЗ («R3788»), и экспрессированного гибридомой РТЗ («hyb») с ПСФ тау и растворимым тау.

[0031] На **фиг. 2** показан вестерн-блот анализ моноклональных анти-тау-антител мыши после SDS-PAGE рекомбинантного нормального тау человека («NT») и нерастворимого в саркозиле ПСФ-тау («РТ»).

[0032] На **фиг. 3А-3Е** показан иммуногистохимический анализ РТЗ в ткани гиппокампа при БА, которая является позитивной в отношении амилоида 4G8. Используемые моноклональные антитела представляли собой **(А)** РТ1, **(В)** РТ2, **(С)** РТЗ, **(D)** АТ8 и **(Е)** НТ7.

[0033] На **фиг. 4А-4Е** показан иммуногистохимический анализ РТЗ в контрольной ткани гиппокампа, которая является негативной в отношении амилоида 4G8. Используемые моноклональные антитела представляли собой **(А)** РТ1, **(В)** РТ2, **(С)** РТЗ, **(D)** АТ8 и **(Е)** НТ7.

[0034] На **фиг. 5А-5В** показана характерная для фосфо-тау картину окрашивания РТЗ в **(А)** нокаутном по тау головном мозге мыши или **(В)** головном мозге мыши дикого типа.

[0035] На **фиг. 6А–6В** показана характерная для нефосфо-тау картину окрашивания тау-1 в (А) нокаутном по тау головном мозге мыши или (В) головном мозге мыши дикого типа.

[0036] На **фиг. 7** показана кристаллическая структура пептидного комплекса PT3 Fab+pT212/pT217-тау, причем PT3 Fab показан в виде заполнения пространства (светло-серый), а тау-пептид показан в виде палочек (черный).

[0037] На **фиг. 8** показана кристаллическая структура пептидного комплекса PT3 Fab+pT212/pT217-тау, где PT3 показан в виде лент (светло-серый), его остатки паратопа показаны в виде палочек, а пептид тау показан в виде палочек (черный).

[0038] На **фиг. 9** показана диаграмма взаимодействия для пептидной структуры PT3 Fab+pT212/pT217-тау, причем пептидные остатки показаны черными прямоугольниками с белыми буквами, остатки VH показаны темно-серым, остатки VL показаны светло-серым, и при этом пунктирные линии изображают водородные связи, а сплошные линии изображают контакты Ван-дер-Ваальса.

[0039] На **фиг. 10** показаны последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей HFA PT3, где варианты HFA выровнены с родительскими V-областями мыши PT3 (VH10 и VL7), родительские CDR, перенесенные в FR человека, подчеркнуты, а нумерация остатков является последовательной.

[0040] На **фиг. 11** показана кристаллическая структура пептидного комплекса B324+pT212/pT217-тау, причем B324 в виде заполнения пространства (светло-серый), а тау-пептид показан в виде палочек (черный).

[0041] На **фиг. 12** показана кристаллическая структура пептидного комплекса B324 +pT212/pT217-тау, где B324 показан в виде лент (светло-серый), его остатки паратопа показаны в виде палочек, а пептид тау показан в виде палочек (черный), обратите внимание, что D92 (L) и E93 (L) не имеют электронной плотности для атомов C α и карбоксилата боковой цепи.

[0042] На **фиг. 13** показана диаграмма взаимодействия для пептидной структуры B324+pT212/pT217-тау, причем пептидные остатки показаны черными прямоугольниками с белыми буквами, остатки VH показаны темно-серым, остатки VL показаны светло-серым, и при этом пунктирные линии изображают водородные связи, а сплошные линии изображают контакты Ван-дер-Ваальса.

[0043] На **фиг. 14** показана схема клеточной модели биосенсора FRET.

[0044] На **фиг. 15** показано ингибирование посредством РТЗ индукции агрегатов K18, высеянной гомогенатами клеток НЕК, содержащими агрегаты GFP-tauP301L, как определено с использованием анализа BRET.

[0045] На **фиг. 16** показано ингибирование РТЗ индукции агрегатов K18, с «семенами» гомогенатов спинного мозга TgP301S, как определено с использованием анализа FRET.

[0046] На **фиг. 17** представлены результаты анализа иммунодеплеции экстракта спинного мозга мыши TgP301S с данными двух независимых экспериментов.

[0047] На **фиг. 18** показаны результаты анализа иммунодеплеции экстракта головного мозга человека с данными из 2 экспериментов (за исключением случая НТ7 и АТ8, для которых n=1). РТЗ ингибирует образование «семян» тау, определенное с помощью анализа FRET.

[0048] На **фиг. 19А–19G** показана схема модели инъекции у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный тау P301L человека. На изображениях ИГС представлено репрезентативное окрашивание АТ8 из полушарий в которые проводилась инъекция у мышей, которым инъецировали (**А–В**) контрольный экстракт через 3 месяца после инъекции (**С–D**) оПСФ-тау, полученные из головного мозга, пораженного БА, через 1 месяц после инъекции и (**Е–F**) оПСФ-тау, полученные из головного мозга, пораженного БА, через 3 месяца после инъекции. (**G**) В гистограмме представлены репрезентативные данные биохимии от мышей, получавших увеличение количества оПСФ.

[0049] На **фиг. 20** показано влияние на агрегацию тау периферического введения (в/б) РТЗ с последующим посевом с помощью ПСФ-тау, полученного из головного мозга, пораженного БА, у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный тау P301L человека.

[0050] На **фиг. 21** представлено влияние агрегации тау на совместную инъекцию снижающихся доз РТЗ с последующим посевом с помощью ПСФ-тау, полученным из головного мозга, пораженного БА, у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный тау P301L человека.

[0051] На **фиг. 22А–22С** показано влияние на агрегацию тау при совместной инъекции в сочетании с периферическим в/б-введением изотипов РТЗ с последующим посевом с использованием ПСФ-тау, полученного из головного мозга, пораженного БА, у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный тау P301L человека.

Мыши, обработанные в соответствии с (А), показывают эффект в (В) полушарии в которое осуществляли инъекцию и (С) в полушарии в которое не осуществляли инъекцию.

[0052] На **фиг. 23А–23В** показаны уровни агрегированных тау в гомогенатах головного мозга, полученных от пациентов с ПНП, по сравнению с уровнями гомогенатов мозга, полученных от пациентов с БА. В качестве моноклональных антител использовали (А) АТ8 и (В) РТ3.

[0053] На **фиг. 24А–24J** показано окрашивание с антителами (А–С) АТ8 или (D–F) РТ3 на криосрезах мозговой ткани пациентов с БА (А, D) или (В, С, Е, F) пациентов с ПНП, которые продемонстрировали окрашивание в анатомических областях, пораженных в ПНП. Контроли (G–J) не продемонстрировали окрашивания.

[0054] На **фиг. 25А–25Н** показаны сенсограммы SPR связывания для mAb с созревшей аффинностью и их Fab с ПСФ-тау. Сплошные линии (серые) указывают на подгонку кинетики с использованием модели двухвалентного связывания (mAb) или модели Ленгмюра 1:1 (Fab). (А) mAb B296 (В) mAb B711 (С) mAb B809 (D) mAb B333 (Е) Fab B324 от B296 (F) Fab B330 от B711 (G) Fab B332 от B809 (H) Fab B331 от B333.

[0055] На **фиг. 26А–26В** показано связывание РТ3-НФА и вариантов с созревшей аффинностью с пептидом рТ212/рТ217 в эксперименте с прямым ИФА с использованием (А) mAb или (В) Fab.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0056] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

[0057] *Определения*

[0058] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в

настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они полностью излагались в настоящем документе. Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0059] Если не указано иное, любое числовое значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, описанное в данном документе, следует понимать как модифицированное во всех случаях посредством термина «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас/об) включает от 0,9% (мас/об) до 11% (мас/об). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

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

[0061] Используемый в данном изобретении термин «антитело» или «иммуноглобулин» используется в широком значении и относится к иммуноглобулинам или молекулам антител, включая поликлональные

антитела, моноклональные антитела включая мышинные/крысиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антител.

[0062] В общем смысле антитела являются белками или пептидными цепочками, которые специфически связываются со специфическим антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по данному изобретению могут быть любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитела по данному изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела по данному изобретению включают антитела, которые имеют вариации в своей области Fc, так что они имеют измененные свойства по сравнению с областями Fc дикого типа, включая, но не ограничиваясь этим, увеличенный период полужизни, сниженную или повышенную АЗКЦ или КЗЦ и подавленные эффекторные функции Fc. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа и лямбда. Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела по изобретению содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи, антител мыши или антител человека.

[0063] В дополнение к тяжелым и легким константным доменам антитела содержат переменные области легкой и тяжелой цепи. Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из «каркасной» области, прерываемой «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определяются с использованием различных терминов и схем нумерации следующим образом:

(i) Kabat: «Определяющие комплементарность области» или «CDR» основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970). Как правило, антигенсвязывающий сайт имеет три CDR в каждой переменной области (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в переменной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в переменной области легкой цепи (VL));

(ii) Chothia: Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по структуре, как определено Chothia и Lesk. (Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987). В целом, антигенсвязывающий участок имеет три гипервариабельных участка в каждой VH (H1, H2, H3) и VL (L1, L2, L3). Системы нумерации, а также аннотации CDR и HV были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008);

(iii) IMGT: Другое определение областей, которые образуют антигенсвязывающий сайт, было предложено Lefranc (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003) основанное на сравнении V-доменов иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) приводится стандартизованное обозначение и определение этих участков. Соответствие между CDR, HV и IMGT подробно описано у Lefranc et al., 2003, *Id.*;

(iv) AbM: Компромисс между схемами нумерации Kabat и Chothia – соглашение о нумерации AbM, описано Martin (Martin ACR (2010) *Antibody Engineering*, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2, pp 33-51).

(v) Антигенсвязывающий сайт также может быть обозначен на основании «Использования остатка для определения специфичности» (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004), где SDR относится к аминокислотным остаткам иммуноглобулина, которые непосредственно вовлечены в контакт с антигеном.

[0064] «Каркас» или «каркасная последовательность» представляет собой оставшиеся последовательности в вариабельной области антитела, кроме тех, которые определяются как последовательности антигенсвязывающего участка. В связи с тем, что точное определение антигенсвязывающего участка может быть обозначено различными дефинициями, как описано выше, точная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего участка. Каркасные области (FR) являются наиболее высоко консервативными частями вариабельных доменов. Каждый вариабельный домен нативных тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно), которые обычно принимают конфигурацию бета-складки, соединенную тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FR

и, вместе с гипервариабельными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил связь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799–817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175–182, 1990). Несмотря на их высокую вариабельность последовательности, пяти из шести петель принимают только небольшой набор конформаций главной цепи, называемых «каноническими структурами». Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях петель и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные основные конформации цепей.

[0065] При использовании в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и сегмент Fd константной области тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0066] Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» относится к нечеловеческому антителу, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности по сравнению с антителом человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его

антигенность в человеческом теле уменьшается.

[0067] Используемый в данном документе термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом в третичной структуре белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996).

[0068] Используемый в данном документе термин «тау» или «тау-белок» относится к распространенному белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе человека (ЦНС) существует шесть основных изоформ тау размером от 352 до 441 аминокислот из-за альтернативного сплайсинга (Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009). Изоформы отличаются друг от друга регулируемым включением 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 тандемно расположенных связывающих микротрубочки повторов, и называются 0N3R (SEQ ID NO: 64), 1N3R (SEQ ID NO: 65), 2N3R (SEQ ID NO: 66), 0N4R (SEQ ID NO: 67), 1N4R (SEQ ID NO: 68) и 2N4R (SEQ ID NO: 69). Используемый в данном документе термин «контрольный тау» относится к изоформе тау SEQ ID NO: 69, которая лишена фосфорилирования и других посттрансляционных модификаций. Используемый в данном документе термин «тау» включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау дикого типа. Термин «тау» также охватывает посттрансляционные модификации аминокислотной последовательности тау. Посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются этим, фосфорилирование.

[0069] Тау-белок связывает микротрубочки и регулирует транспорт карго через клетки, процесс, который может быть

модулирован фосфорилированием тау-белков. При БА и подобных ей расстройствах преобладает патологическое фосфорилирование тау-белков, которое, как считают, предшествует и/или запускает агрегацию тау-белков в фибриллы, называемые парными спиральными филаментами (ПСФ). Основным компонентом ПСФ является гиперфосфорилированный тау. Используемый в данном документе термин «парный спиральный филамент-тау» или «ПСФ-тау» относится к агрегатам тау в парных спиральных филаментах. При исследовании методом электронной микроскопии обнаруживаются два основных участка в структуре ПСФ, размытая оболочка и стержневой филамент; чувствительная к протеолизу размытая оболочка располагается снаружи филамента, а протеазоустойчивый стержень филамента образует остов ПСФ (Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4884-8, 1988).

[0070] Термины «выделенное гуманизированное антитело, которое связывает ПСФ-тау» или «выделенное гуманизированное анти-ПСФ-тау-антитело», используемые в данном документе, предназначены для обозначения гуманизированного анти-ПСФ-тау-антитела, которое по существу не содержит других антител, имеющих различные антигенные специфичности (например, выделенное гуманизированное анти-ПСФ-тау-антитело по существу не включают антитела, которые специфически связывают антигены, отличные от ПСФ-тау). Однако выделенное гуманизированное анти-ПСФ-тау-антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, от других видов (таких как гомологи видов ПСФ-тау).

[0071] Используемый в данном документе термин «специфически связывает» или «специфическое связывание» относится к способности анти-ПСФ-тау-антитела по изобретению связываться с заранее определенной мишенью с константой диссоциации (K_D), равной около 1×10^{-6} М или менее, например, около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-12} М или менее или около 1×10^{-13} М или менее. K_D получают из отношения K_d к K_a (то есть K_d/K_a) и выражают как молярную концентрацию (М). Значения K_D для антител можно определять, используя способы данной области техники, относящиеся к настоящему описанию. Например, значение K_D анти-ПСФ-тау-антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, такого как биосенсорная система, например система Biacore®, инструмент

Proteon (BioRad), инструмент KinExA (Sapidyne), ИФА или анализ конкурентного связывания, известных специалистам в данной области техники. Как правило, анти-ПСФ-тау-антитело связывается с заранее определенной мишенью (то есть ПСФ-тау) с K_D , которая по меньшей мере в десять раз меньше, чем его K_D для неспецифической мишени, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например инструмента ProteOn (BioRad). Однако анти-ПСФ-тау-антитела, которые специфически связываются с ПСФ-тау, могут иметь перекрестную реактивность по отношению к другим связанным мишеням, например, к той же предварительно определенной мишени других видов (гомологов).

[0072] Используемый в данном документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термину «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК, либо модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает в себя ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

[0073] Используемый в данном документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть вставлен

другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

[0074] Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0075] Используемый в данном документе термин «экспрессия» относится к биосинтезу генного продукта. Данный термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Данный термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того, охватывает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированное гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают ПСФ-тау, может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как ростовая среда клеточной культуры, или быть прикрепленным к клеточной мембране.

[0076] В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с

настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

[0077] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному и предпочтительно млекопитающему. Согласно конкретным вариантам осуществления, субъектом является млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0078] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которые вызывают желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. К примеру, для помощи в определении оптимального диапазона доз можно необязательно использовать анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы может быть определен (например, с помощью клинических испытаний) специалистами в данной области техники на основании рассмотрения нескольких факторов, включая заболевание, которое нужно лечить или предотвращать, симптомы, вовлеченные в процесс, массу тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области техники. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также будет зависеть от пути введения и степени тяжести заболевания и должна определяться на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделях.

[0079] В контексте данного документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, относящегося к таупатии, который не обязательно очевиден у пациента, но может быть видимым у пациента. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также

относиться к провоцированию регрессии, профилактике прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с таупатией. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

[0080] При использовании в настоящем документа «таупатия» охватывает любое нейродегенеративное заболевание, для которого характерна патологическая агрегация тау-белка в головном мозге. В дополнение к наследственной и спорадической БА, другие примеры таупатий включают лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Пика, прогрессивный субкортикальный глиоз, деменцию с образованием только клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию с аргирофильными зернистыми шарами, комплекс боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдром Дауна, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, болезнь Крейцфельда-Якоба, множественную системную таупатию, липоидный гистиоцитоз тип С, церебральную амилоидную ангиопатию с отложением прионного белка, подострый склерозирующий панэнцефалит, дистрофическую миотонию, боковой амиотрофический склероз с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм и хроническую травматическую энцефалопатию, такую как *dementia pugilistica* (кулачная болезнь) (Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011).

[0081] В настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Применение термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором лекарственные средства вводят пациенту. Например, первое терапевтическое

средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

[0082] Анти-ПСФ-тау-антитела

[0083] В одном общем аспекте изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают ПСФ-тау. Такие анти-ПСФ-тау-антитела могут иметь свойства связывания фосфорилированного эпитопа на ПСФ-тау-белке или связывания нефосфорилированного эпитопа на ПСФ-тау-белке. Анти-ПСФ-тау-антитела могут использоваться в качестве лекарственных средств, как исследовательские или диагностические реагенты для обнаружения ПСФ-тау-белка в биологических пробах, например в тканях или клетках.

[0084] В соответствии с конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с фосфорилированным тау-белком на эпитопе в богатом пролином домене тау-белка. В более конкретном аспекте изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с фосфорилированным тау-белком в эпитопе, содержащем фосфорилированные остатки T212 и/или T217. В более конкретном аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с фосфорилированным эпитопом любой из SEQ ID NO: 48, 52 и 54. В еще более конкретном аспекте изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с фосфорилированным эпитопом SEQ ID NO: 48. Антитело по изобретению может представлять собой гуманизированное антитело.

[0085] В таблице 1 представлены переменные области

тяжелой и легкой цепей для 5 гуманизированных mAb (моноклональных антител), которые связываются с фосфо-тау с помощью SEQ ID NO. Последовательности тяжелой и легкой цепей также представлены для гуманизированного mAb B296. Это mAb является антителом с созревшей аффинностью (см. таблицу 3).

[0086] В таблице 2 показаны остатки антигенсвязывающего сайта (то есть области CDR) иллюстративных антител по изобретению, определенные в соответствии со схемами нумерации Chothia, ABM, Kabat и IMGT. Аминокислотные последовательности иллюстративных переменных областей тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 26-29, а аминокислотные последовательности иллюстративных переменных областей легкой цепи показаны в SEQ ID NO: 31-34.

[0087] В таблице 3 показаны последовательности моноклональных антител с созревшей аффинностью, полученных из B296 (т.е. B333, B711 и B809). Последовательности переменной области подчеркнуты в последовательностях тяжелой и легкой цепей. Аминокислоты, выделенные жирным шрифтом в CDR моноклональных антител с созревшей аффинностью, указывают на замену по сравнению с последовательностью CDR B296. Последовательности CDR определяются по схемам нумерации Kabat.

Таблица 1: Гуманизированные фосфо-тау mAb

mAb	V _H	V _L	Тяжелая цепь	Легкая цепь
B235	26	31		
B252	28	34		
B280	26	34		
B282	28	31		
B296	27	31	45	46

Таблица 2: Последовательности CDR для доменов V_H (VH10) и V_L (VL7) гуманизированного анти-ПСФ-тау-антитела B296

Идентификатор V-области	Схема нумерации Chothia		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (SEQ ID NO: 1)	SKGGN (SEQ ID NO: 2)	GWGDYGWFAFAY (SEQ ID NO: 3)

VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 13)	RANRLLD (SEQ ID NO: 14)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 15)
	Схема нумерации ABM		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 4)	SISKGGNTY (SEQ ID NO: 5)	GWGDYGWFAFAY (SEQ ID NO: 6)
VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 16)	RANRLLD (SEQ ID NO: 17)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 18)
	Схема нумерации Kabat		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	SYAMS (SEQ ID NO: 7)	SISKGGNTYYPNVSKG (SEQ ID NO: 8)	GWGDYGWFAFAY (SEQ ID NO: 9)
VL7	KASQDINRYLN (SEQ ID NO: 19)	RANRLLD (SEQ ID NO: 20)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 21)
	Схема нумерации IMGT		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 10)	ISKGGNT (SEQ ID NO: 11)	ARGWGDYGWFAFW (SEQ ID NO: 12)
VL7	QDINRY (SEQ ID NO: 22)	RAN (SEQ ID NO: 23)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 24)

Таблица 3: B296 с созревшей аффинностью

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
PT1B333				
	V _H	CDR1	80	SSYAMS
		CDR2	81	SISKGGNTYYADSVKG
		CDR3	9	GWGDYGWFAFAY
		Тяжелая цепь	74	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS</u> <u>SYAMSWVRQAPGKGLE</u>

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
				<u>WVASISKGGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAV</u> <u>YYCARGWGDYGFAYWGQVTLVT</u> <u>VSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Легкая цепь	75	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDIN</u> <u>RWLNWFQOKPGKAPK</u> <u>SLIYRANRLLDGVPSRFS</u> <u>SGSGSGTDFTLTI</u> <u>SSLOPEDFATYYCLO</u> <u>YDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI</u> <u>FPP</u> SDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
PT1B711				
	V _H	CDR1	71	TSYAMS

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGWFAF
		Тяжелая цепь	76	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFT</u> <u>SYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTAVYYCARGWGIYGWFAFYGQVTLTV</u> <u>SSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Легкая цепь	77	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIN</u> <u>RWLNWFQOKPGKAP</u> <u>KSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLOPEDFATYYC</u> <u>LQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF</u> PPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSTYSLSS

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
				TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
PT1B809				
	V _H	CDR1	71	T SYAMS
		CDR2	72	SI T KGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGI I YGFAY
		Тяжелая цепь	78	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFT</u> <u>SYAMSWVRQAPG</u> <u>KGLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISR</u> <u>NSKNTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCARGWGIYGFAYWGQVTLV</u> <u>TVSSASTKGPSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	V _L	CDR1	19	KASQDINRYLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Легкая цепь	79	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIN</u> <u>RYLNWFQQKPG</u> <u>KAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDF</u>

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
				<u>TLTISSLOPED</u> <u>FATYYCLOYDEFPLTFGOGTKLEIKRTVAA</u> PSVFIFFPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGEC

[0088] Гуманизированные антитела имеют каркасные остатки вариабельной области, по существу, из антитела человека (называемого акцепторным антителом) и определяющие комплементарность области, по существу, из антитела, полученного не от человека (то есть антитела мыши) (называемого донорским иммуноглобулином). См. Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. США*. 86:10029-10033, 1989, WO 90/07861, US5693762, US5693761, US5585089, US5530101 и US5225539. Константная область (-и), если они присутствуют, также по существу или полностью получены из иммуноглобулина человека. Вариабельные домены человека обычно выбирают из антител человека, чьи каркасные последовательности демонстрируют высокую степень идентичности последовательности с доменами вариабельной области мыши, из которых были получены CDR. Остатки каркасной области вариабельной области тяжелой и легкой цепей могут быть получены из одинаковых или разных последовательностей антител человека. Последовательности антител человека могут быть последовательностями природных антител человека или могут быть консенсусными последовательностями нескольких антител человека. См. WO 92/22653. Определенные аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека выбирают для замены на основе их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных воздействий осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирического наблюдения за эффектами замещения или мутагенеза конкретных аминокислот.

[0089] Например, когда аминокислота отличается между остатком каркасной вариабельной области мыши и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, каркасная аминокислота человека обычно должна быть заменена эквивалентной

каркасной аминокислотой из антитела мыши, когда разумно ожидается, что аминокислота: (1) нековалентно связывается с антигеном напрямую, (2) соседствует с областью CDR, (3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 ангстрем от области CDR), или (4) участвует в границе взаимодействия VL-VH.

[0090] Другими кандидатами на замену являются акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этом положении. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентного положения донорского антитела мыши или из эквивалентных положений более типичных иммуноглобулинов человека. Другими кандидатами на замену являются акцепторные каркасные аминокислоты человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этом положении. Каркасные последовательности вариабельной области гуманизированных иммуноглобулинов обычно демонстрирует по меньшей мере 85% идентичности последовательности с каркасной последовательностью вариабельной области человека или консенсусом таких последовательностей.

[0091] Гуманизация антител может быть осуществлена с использованием хорошо известных способов, таких как ремоделирование поверхности остатков, определяющих специфичность (SDRR) (US 2010/0261620), ремоделирование поверхности (Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991), супер гуманизация (WO 04/006955) и оптимизация содержимого строки человека (US7657380). Специалисты в данной области техники могут выбирать каркасные последовательности человека, полезные для прививки или гуманизации. Выбранные каркасы могут быть дополнительно модифицированы для сохранения или повышения аффинности связывания такими способами, как те, которые описаны в Queen et al., 1989, *Id.* Согласно конкретным вариантам осуществления способы гуманизации анти-ПСФ-тау-антител из родительских антител мыши включают способы, описанные в примере 4 ниже.

[0092] Антитела, раскрываемые в данном изобретении могут быть произведены с использованием различных методов, к примеру гибридомный метод (Kohler and Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975). Химерные моноклональные антитела, содержащие вариабельную область легкой и тяжелой цепи, полученные из донорного антитела (обычно мышинного) и постоянные области легкой и тяжелой цепей, полученные из акцепторного антитела (обычно другого вида

млекопитающих, например, человека), можно получить по методу, описанному в патенте US4816567. CDR-привитые моноклональные антитела, имеющие CDR из донорного не человеческого иммуноглобулина (обычно мышинного) и оставшиеся части молекулы, взятые из одного или нескольких человеческих иммуноглобулинов, можно получить с помощью методик, известных специалистам, например, как описано в US5225539. Полностью человеческие моноклональные антитела, лишенные каких-либо последовательностей, полученных не от человека, могут быть получены от трансгенных мышей с иммуноглобулином человека способами, указанными в (Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994; Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996; Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997). Моноклональные антитела человека также могут быть получены и оптимизированы из библиотек фагового дисплея (Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001; Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010).

[0093] Моноклональные антитела по изобретению, включают антитела, имеющие HCDR1 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 71, 80; HCDR2 любой из SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 72, 81; HCDR3 любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 73; LCDR1 любой из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 70; LCDR2 любой из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23; LCDR3 любой из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24. Изобретение также охватывает моноклональные антитела, которые имеют последовательности CDR, которые на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичны, более предпочтительно на по меньшей мере 99% идентичны HCDR1 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 71, 80; HCDR2 любой из SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 72, 81; HCDR3 любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 73; LCDR1 любой из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 70; LCDR2 любой из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23; LCDR3 любой из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24.

[0094] Согласно конкретному аспекту изобретение относится к выделенным гуманизированным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно;

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные

последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно;

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно;

(5) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(6) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(7) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72 и 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(8) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(9) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(10) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(11) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает ПСФ-тау, предпочтительно ПСФ-тау человека, и при этом каркасные области в домене вариабельной области тяжелой цепи и в домене вариабельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности из иммуноглобулина человека.

[0095] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированном антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 29, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34.

[0096] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированном антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную вариабельной области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 74, 76 и 78, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, на по меньшей мере 85%, предпочтительно на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичную, и наиболее предпочтительно на 100% идентичную вариабельной области легкой цепи любой из SEQ ID NO: 75, 77 и 79.

[0097] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированном антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 26, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%,

предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 31.

[0098] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 28, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 34.

[0099] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 26, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 34.

[00100] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID

NO: 28, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 31.

[00101] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 27, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 31.

[00102] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 74 и или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, на по меньшей мере 85%, предпочтительно на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичную, и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 75.

[00103] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность

на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 76 и или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, на по меньшей мере 85%, предпочтительно на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичную, и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 77.

[00104] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 78 и или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, на по меньшей мере 85%, предпочтительно на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичную, и наиболее предпочтительно на 100% идентичную переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 79.

[00105] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 45, или легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее

предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 46. В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45 и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 46.

[00106] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированном антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 74, или легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 75. В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 74 и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 75.

[00107] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированном антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 76, или легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 77. В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 76 и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 77.

[00108] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 78, или легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 79. В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 78 и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 79.

[00109] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой цепи каппа человека.

[00110] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с ПСФ-тау человека с константой диссоциации (K_D), равной 5×10^{-9} М или менее, предпочтительно K_D , равной 1×10^{-9} М или менее или 1×10^{-10} М или менее, при этом K_D измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы Biacore или ProteOn.

[00111] Функциональная активность гуманизированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ПСФ-тау, может быть охарактеризована способами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ПСФ-тау, включают, но не ограничиваются ими,

анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, ИФА и FACS; иммуногистохимический анализ; клеточные анализы *in vitro* и инъекционные анализы *in vivo* для определения эффективности антител в подавлении образования «семян» тау; анализы клеточной цитотоксичности для выявления наличия антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксической (КЗЦ) активности антител; и т.д. В соответствии с конкретным вариантом осуществления способы для характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ПСФ-тау, включают те, которые описаны в Примерах 5, 6, 8 и 9 ниже. Примером родительского антитела мыши гуманизированных антител, связывающего ПСФ-тау, но не контрольное тау, является антитело РТЗ, которое имеет переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 30 (см., например, патент США № 9371376, который полностью включен в данный документ посредством ссылки).

[00112] Несколько хорошо известных способов могут быть использованы для определения эпитопа антител, предложенных в данном изобретении. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено избирательное замещение водорода дейтерием (H/D) в комплекса антигена и антитела с целью картирования участков антигена, которые связываются с антителом. Сегментный и точечный мутагенез антигена можно использовать для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот. Со-кристаллическая структура комплекса антиген-антитело используется для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа. Согласно конкретным вариантам осуществления способы определения эпитопа связывания антител по изобретению включают те, которые описаны в Примерах 2, 3 и 7 ниже.

[00113] Антитела, раскрываемые в данном изобретении, могут быть биспецифическими или полиспецифическими. Пример биспецифического антитела может связывать два отдельных эпитопа на ПСФ-тау-белке или может связывать ПСФ-тау-белок и бета-амилоид (Абета). Другой пример биспецифического антитела может связывать ПСФ-тау-белок и рецептор эндогенного трансцитоза через

гематозэнцефалический барьер, такой как инсулиновый рецептор, трансферриновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора I и липопротеиновый рецептор. Примером антитела является IgG 1 типа.

[00114] Иммунные эффекторные свойства антител по изобретению могут быть улучшены или подавлены с помощью модификаций Fc способами, известными специалистам в данной области техники. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.п. может обеспечиваться и контролироваться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие полужизнь антител, могут также улучшить фармакокинетические свойства (Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009).

[00115] Кроме того антитела, раскрываемые в данном изобретении, могут быть модифицированы на пост-трансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как присоединение нативной молекулы полиэтиленгликоля или липидизация. Такие модификации могут выполняться *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела, раскрываемые в данном изобретении, могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пегилированы) с целью улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена с помощью способов, известных специалистам в данной области. Показано, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ усиливает фармакодинамику, не влияя на функцию (Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine.* 16:106-19, 2001; Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003).

[00116] Изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, посредством замены, удаления, вставки и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие гуманизированные антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков. Типичными выделенными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие CDR тяжелой цепи иммуноглобулина HCDR1, HCDR2 и HCDR3, приведенные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, или полипептиды, содержащие CDR легкой цепи иммуноглобулина LCDR1, LCDR2 и LCDR3, приведенные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно. Другими иллюстративными выделенными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 36-39 или 41-44, кодирующие вариабельные области антитела по изобретению. Другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессионной системе, кодируют предложенные антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, также входят в объем настоящего изобретения. Изолированные нуклеиновые кислоты, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть изготовлены с использованием хорошо известных методов рекомбинации или синтеза. ДНК, кодирующие моноклональные антитела, легко изолируются и секвенируются с помощью методов, известных специалистам в данной области. При создании гибридом такие клетки могут служить источником такой ДНК. Альтернативно, могут быть использованы способы отображения, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции связаны, такие как библиотеки фагового или рибосомального дисплея.

[00117] В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного раскрытия, такой как плазмида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазмида. Вектор может содержать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, связывающий рибосому элемент, терминатор, энхансер, селективный маркер и источник репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцибельным или репрессируемым промотором. Ряд экспрессирующих векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известен в данной области техники и может быть

использован в данном документе для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Обычные методы клонирования или искусственного синтеза генов могут быть использованы для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

[00118] В другом общем аспекте данное изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области техники с учетом данного раскрытия, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, бактериальные, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), например, линии CHO-K1 (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

[00119] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методиками, известными в данной области техники.

[00120] Фармацевтические композиции и способы лечения.

[00121] Анти-ПСФ-тау-антитела по изобретению или их фрагменты по изобретению можно использовать для лечения, уменьшения или предотвращения симптомов у пациентов, страдающих нейродегенеративным заболеванием, которые включают патологическую агрегацию тау в головном мозге, или таупатии, таких как пациенты, страдающие от БА.

[00122] Так, в еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель.

[00123] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения или уменьшения симптомов заболевания, расстройства или состояния, такого как таупатия, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00124] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу уменьшения патологической агрегации тау или распространения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

[00125] Согласно вариантам осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество моноклонального анти-ПСФ-тау-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемое в данном документе со ссылкой на гуманизированные анти-ПСФ-тау-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, терапевтически эффективное количество означает количество моноклонального анти-ПСФ-тау-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или патологического состояния; предотвращение или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или патологического состояния; или уменьшения или полного облегчения симптомом, связанных с иммунным заболеванием, расстройством или патологическим состоянием.

[00126] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которое является достаточным для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания,

расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) регрессия причины заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости пациента с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (xi) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у пациента; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[00127] Согласно конкретным вариантам осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой таупатию. В соответствии с более конкретным вариантом осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, которое подлежит лечению, включает без ограничения, семейную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, деменцию Пика, прогрессивный субкортикальный глиоз, деменцию с образованием только клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию с аргирофильными зернистыми шарами, комплекс боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдром Дауна, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, болезнь Крейцфельда-Якоба, множественную системную атрофию, липоидный гистиоцитоз типа С, церебральную амилоидную ангиопатию с отложением

прионного белка, подострый склерозирующий панэнцефалит, дистрофическую миотонию, боковой амиотрофический склероз с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническую травматическую энцефалопатию или *dementia pugilistica* (кулачная болезнь).

[00128] Поведенческий фенотип, связанный с таупатией, включает без ограничения, нарушение когнитивных функций, раннее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутацизм, апраксию, персерверацию, стереотипные движения/поведение, гипероральность, дезорганизацию, неспособность планирования или выполнения последовательных действий, эгоизм/грубость, антиобщественные личные черты, отсутствие сочувствия, спотыкающуюся неграмотную речь с частыми фразеологическими ошибками, но относительно сохранившееся понимание, нарушенное понимание и сложности с поиском слов, медленно прогрессирующую неустойчивость походки, ретропульсию, замирание, частые падения, ригидность второго шейного позвонка, не отвечающую на введение леводопы, надъядерный паралич взора, судорожные подергивания глазных яблок с характерным прямоугольным сигналом, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, потерю корковой чувствительности и тремор.

[00129] Пациенты, подлежащие лечению, включают, без ограничения, бессимптомных лиц с риском развития БА или другой таупатии, а также пациентов, у которых симптомы проявляются в настоящее время. Пациенты, подлежащие лечению, включают лиц с известным генетическим риском развития БА, таким как семейный анамнез БА или наличие генетических факторов риска в геноме. Примеры факторов риска представляют собой мутации белка-предшественника амилоида (APP), особенно в положении 717 и положениях 670 и 671 (мутация Харди и Шведская мутация, соответственно). Другие факторы риска представляют собой мутации генов пресенилина, PS1 и PS2 и в ApoE4, семейный анамнез гиперхолестеролемии или атеросклероза. Лиц, страдающих БА в настоящее время, можно отличить от старческой деменции по присутствию факторов риска, описанных выше. Кроме того, имеется ряд диагностических тестов для выявления лиц, страдающих БА. К ним относится измерение уровня тау в спинномозговой жидкости и уровней Abeta 42. Повышенные уровни тау и пониженные уровни Abeta 42 указывают на наличие БА. Лица, страдающие от БА, также

могут быть диагностированы по критериям БА и Ассоциации связанных расстройств

[00130] Анти-ПСФ-тау-антитела, раскрываемые в данном изобретении, подходят как в качестве терапевтических, так и профилактических агентов для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, для которых характерна патологическая агрегация тау-белка, таких как БА или другие таупатии. Лечение бессимптомных пациентов можно начинать в любом возрасте (например, примерно в 10, 15, 20, 25, 30 лет). Обычно, однако, нет необходимости начинать лечение, пока пациент не достигнет возраста примерно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно включает многократное введение препаратов в течение некоторого периода времени. Лечение можно мониторировать с помощью количественного определения антитела, или ответа активированных Т-клеток или В-клеток на терапевтический агент на протяжении определенного времени. При снижении ответа может быть показано увеличение дозы введения.

[00131] При применении в профилактических целях фармацевтические композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту, подверженному в той или иной форме риску развития БА, в дозе достаточной для устранения или снижения риска, ослабления степени тяжести или откладывание наступления заболевания на более поздний срок, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, наблюдающиеся в ходе развития заболевания. При применении в терапевтических целях композиции или препараты вводятся пациенту, у которого подозревают или уже диагностировали такое заболевание, в дозе, достаточной для снижения, прекращения или откладывания наступления любых симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих). Введение лекарственного препарата может ослабить или устранить нарушение когнитивных функций легкой степени у пациентов, у которых еще не развилась патология, характерная для болезни Альцгеймера.

[00132] Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли пациент человеком или животным, других введенных

лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

[00133] Антитела, раскрываемые в данном изобретении, могут быть изготовлен в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их стерилизацию можно проводить с использованием общепринятых, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как вещества корректировки pH, буферные вещества, стабилизаторы, сгущающие вещества, лубриканты и окрашивающие добавки и т. д. Концентрация антител, раскрываемых в данном изобретении, агента в таком фармацевтическом составе может варьироваться в широком диапазоне, т.е., от менее чем примерно 0,5%, обычно по меньшей мере примерно 1%, до 15 или 20% по массе, и выбирается, в первую очередь, с учетом требуемой дозы, объема жидкости, вязкости и т. д., в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

[00134] Способ введения антител для терапевтического использования может представлять собой любой подходящий путь введения, который доставляет агент в организм пациента. Например, композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для парентерального введения, например, внутрикожного, внутримышечного, внутривенного, подкожного, интраназального или интракраниального введения, или они могут быть введены в спинномозговую жидкость головного мозга или позвоночника.

[00135] Терапия может представлять режим однократного дозирования или режим многократного дозирования, при этом начальный курс лечения может состоять из 1-10 доз, с последующим введением других доз через определенные промежутки времени, необходимые для сохранения или усиления ответа, например, через

1-4 месяца - введение второй дозы и, при необходимости, еще через несколько месяцев - введение последующей дозы (доз). Примеры подходящих схем лечения включают: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7 дней и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев, или другие схемы, позволяющие получить желаемый ответ, при котором ожидается ослабление симптомов заболевания или степени тяжести заболевания.

[00136] Антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в соответствующем носителе перед использованием. Этот способ зарекомендовал себя эффективным способом для антител и других белковых препаратов, и могут быть использованы известные специалистам методики лиофилизации и восстановления.

[00137] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композицию, используемую для лечения таупатии, можно использовать в сочетании с другими агентами, которые эффективны для лечения связанных нейродегенеративных заболеваний. В случае БА антитела, раскрываемые в данном изобретении, могут вводиться в сочетании с агентами, снижающими или предотвращающим отложение бета-амилоида (Абета). Представляется возможным, что патологии, связанные с ПСФ-тау и Абета, носят синергический характер. Поэтому комбинированная терапия, направленная на одновременное устранение как патологий, обусловленных ПСФ-тау и Абета, так и патологий, обусловленных Абета, может быть более эффективной, чем терапия, направленная на каждое из этих состояний по-отдельности. В случае болезни Паркинсона и относящихся к ней нейродегенеративных заболеваний, иммунная модуляция с целью устранения агрегированных форм белка альфа-синуклеина также является перспективной терапией. Комбинированная терапия, направленная на одновременное устранение обоих из тау-белка и белка альфа-синуклеина может быть более эффективной, чем терапия, направленная на каждый из этих белков по-отдельности.

[00138] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00139] Диагностические способы и наборы

[00140] Моноклональные антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, могут быть использованы в способах диагностирования БА или других таупатий у пациента.

[00141] Таким образом, в другом общем аспекте изобретение относится к способам обнаружения наличия ПСФ тау у субъекта и способам диагностирования таупатии у субъекта путем обнаружения присутствия ПСФ тау у субъекта с помощью моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента данного изобретения.

[00142] Фосфорилированный тау может быть обнаружен в биологическом образце от субъекта (например, крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или образца спинномозговой жидкости) путем контакта биологического образца с реагентом диагностического антитела и обнаружения связывания реагента диагностического антитела с фосфорилированным тау в образце от субъекта. Анализы, проводимые для обнаружения, включают хорошо известные способы, такие как ИФА, иммуногистохимическое исследование, вестерн-блоттинг или *in vivo* визуализация. Типичным диагностическим антителом является антитело РТЗ по изобретению.

[00143] Диагностические антитела или аналогичные реагенты могут быть введены внутривенно в организм пациента или непосредственно в головной мозг любым подходящим путем, который доставляет агент в организм пациента. Доза антитела должна находиться в тех же пределах, что и доза для лечения. Обычно антитело метят, хотя при применении некоторых способов первичное антитело с аффинностью к фосфорилированному тау остается немеченым, и для связывания с первичным антителом используют вторичный агент для мечения. Выбор метки зависит от средства обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для обнаружения оптическими методами. Использование парамагнитной метки подходит для обнаружения методом томографии без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки могут быть также обнаружены с помощью ПЭТ или ОФЭКТ.

[00144] Диагноз выполнение с помощью сравнения количества, размера и/или интенсивности меченого ПСФ-тау-белка, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков в пробе, забранной у пациента или в организме пациента, с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни у популяции здоровых людей. Исходные значения могут также

представлять собой предшествующие уровни, определенные у того же пациента.

[00145] Диагностические способы, описанные выше, могут также использоваться для мониторингования ответа пациента на терапию посредством обнаружения наличия фосфорилированного тау у организме пациента до, в течение или после лечения. Снижение значений относительно исходного уровня свидетельствует о положительном ответе на лечение. Величины могут также временно повышаться в биологических жидкостях по мере того, как патологические тау-белки выводятся из головного мозга.

[00146] Настоящее изобретение далее направлено на создание набора для выполнение исследований описанными выше диагностическими способами и способами мониторингования. Типично, такой набор содержит диагностический реагент, такой как антитела, раскрываемые в настоящем изобретении, и в качестве опции обнаруживаемую метку. Диагностическое антитело само по себе может содержать обнаруживаемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин, и т. д.), которая обнаруживается непосредственно или обнаруживается через вторичную реакцию (например, реакция со стрептавидином). Альтернативным образом, может использоваться второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, при этом второй реагент имеет специфичность связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, подходящем для измерения ПСФ-тау в биологической пробе, антитела в наборе могут подставляться заранее связанными с твердой фазой, такой как лунки микротитрационного планшета.

[00147] Все упомянутые работы (в том числе книги, патенты, опубликованные патентные заявки на патент и патентные заявки, одновременно находящиеся на рассмотрении) включены в текст данной заявки посредством ссылки.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00148] В настоящем изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[00149] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с фосфорилированным тау-белком на фосфорилированном эпитопе в богатом пролином домене тау-белка.

[00150] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент, которое связывается с фосфорилированным тау-белком по фосфорилированному эпитопу, содержащему фосфорилированный T212 тау-белка, предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фосфорилированным эпитопом, имеющим или находящимся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

[00151] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с фосфорилированным тау-белком по фосфорилированному эпитопу, содержащему фосфорилированный T217 тау-белка, предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фосфорилированным эпитопом, имеющим или находящимся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

[00152] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с фосфорилированным тау-белком по фосфорилированному эпитопу, содержащему фосфорилированный T212 и фосфорилированный T217 тау-белка, предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с фосфорилированным эпитопом, имеющим или находящимся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

[00153] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно;

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно;

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно, и

LCDR1, Lcdr2 и Lcdr3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно;

(5) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81 и 9, соответственно, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(6) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, соответственно, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(7) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72 и 73, соответственно, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(8) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3 области V_L, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(9) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3 области V_L, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(10) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3 области V_L, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(11) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3 области V_L, имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

причем антители или его антигенсвязывающий фрагмент связывают ПФС-тау, и

при этом каркасные области в домене вариабельной области тяжелой цепи и в домене вариабельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности из иммуноглобулина человека.

[00154] Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 29,

или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34.

[00155] Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную вариабельной области легкой цепи любой из SEQ ID NO: 74, 76 и 78, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, на по меньшей мере 85%, предпочтительно на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 98% идентичную, и наиболее предпочтительно на 100% идентичную вариабельной области легкой цепи любой из SEQ ID NO: 75, 77 и 79.

[00156] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (1) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;
- (2) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;
- (3) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;
- (4) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;
- (5) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;
- (6) V_H , имеющую полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 74 и V_L , имеющую полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 75;
- (7) V_H , имеющую полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 76 и V_L , имеющую полипептидную последовательность

легкой цепи SEQ ID NO: 77; или

(8) V_H , имеющую полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 78 и V_L , имеющую полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 79.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80% предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 45, или легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 98% идентичную и наиболее предпочтительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 46.

[00157] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, содержащее константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой цепи каппа человека.

[00158] Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающееся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с ПСФ-тау человека с K_D , равной 5×10^{-9} М или менее, предпочтительно K_D , равной 1×10^{-9} М или менее или 1×10^{-10} М или менее, при этом K_D измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы Biacore.

[00159] Вариант осуществления 12 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-12.

[00160] Вариант осуществления 13 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 12.

[00161] Вариант осуществления 14 представляет собой клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 13.

[00162] Вариант осуществления 15 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00163] Вариант осуществления 16 представляет собой способ уменьшения патологической агрегации тау или распространения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00164] Вариант осуществления 17 представляет собой способ лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

[00165] Вариант осуществления 18 представляет собой способ по варианту осуществления 17, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента для лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом.

[00166] Вариант осуществления 19 представляет собой способ лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 15, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, деменции Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с образованием только клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернистыми шарами, комплекса боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейцфельда-Якоба, множественной системной атрофии, липоидного гистиоцитоза типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с отложением прионного белка, подострого склерозирующего панэнцефалита, дистрофической миотонии, бокового амиотрофического склероза с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма и хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (кулачная болезнь).

[00167] Вариант осуществления 20 представляет собой способ

по варианту осуществления 19, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента для лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом.

[00168] Вариант осуществления 21 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток.

[00169] Вариант осуществления 22 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, включающий объединение антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00170] Вариант осуществления 23 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11 для применения при лечении таупатии у субъекта, нуждающегося в этом.

[00171] Вариант осуществления 24 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 15 для применения при лечении таупатии, например, семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, деменции Пика, прогрессивного субкортикального глиоза, деменции с образованием только клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернистыми шарами, комплекса боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейцфельда-Якоба, множественной системной атрофии, липоидного гистиоцитоза типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с отложением прионного белка, подострого склерозирующего панэнцефалита, дистрофической миотонии, бокового амиотрофического склероза с

нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма или хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (кулачная болезнь) у субъекта, нуждающегося в этом.

[00172] Вариант осуществления 25 представляет собой применение выделенного моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-11 для изготовления лекарственного средства при лечении таупатии у субъекта, нуждающегося в этом.

[00173] Вариант осуществления 26 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, для производства лекарственного средства для лечения таупатии, например, семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, деменции Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с образованием только клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернистыми шарами, комплекса боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейцфельда-Якоба, множественной системной атрофии, липоидного гистиоцитоза типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с отложением прионного белка, подострого склерозирующего панэнцефалита, дистрофической миотонии, бокового амиотрофического склероза с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма или хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (кулачная болезнь) у субъекта, нуждающегося в этом.

[00174] Вариант 27 осуществления представляет собой способ обнаружения присутствия фосфорилированного тау в биологическом образце от субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-11 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента ПСФ-тау в образце от субъекта.

[00175] Вариант осуществления 28 представляет собой способ по варианту осуществления 27, в котором биологический образец представляет собой образец крови, сыворотки, плазмы,

интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

[00176] Вариант 29 осуществления представляет собой способ диагностирования таупатии у субъекта посредством обнаружения присутствия фосфорилированного тау в биологическом образце от субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-11 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента ПСФ-тау в образце от субъекта.

ПРИМЕРЫ

[00177] Для дополнительной иллюстрации характера настоящего изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие ниже примеры не ограничивают изобретение, и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

[00178] Пример 1 – Характеристика антител

[00179] РТЗ и набор антител, полученных в результате иммунизации мыши Balb/c обогащенным ПСФ-тау (оПСФ-тау) из головного мозга, пораженного БА, тестировали на целевую селективность для фосфо-тау по сравнению с не-фосфо-тау в прямом иммуноферментном анализе (ИФА), вестерн-блоттинге и иммуногистохимии (ИГС). РТЗ представляет собой антитело, полученное из гибридомы мыши, имеющее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 30. Последовательности CDR для VH- и VL-доменов РТЗ приведены в патенте США № 9371376. Антитело РТЗ было гуманизировано с использованием метода адаптации человеческого каркаса (НФА) (см. Пример 4) для получения гуманизированных анти-фосфо-тау-антител по изобретению (см. Таблицы 1 и 2). Гуманизированное антитело B296 имеет те же последовательности CDR, что и РТЗ. Гуманизированному mAb B296 обеспечивали созревание аффинности для получения дополнительных антител по изобретению (см. Таблицу 3).

[00180] ИФА

[00181] Рекомбинантное РТЗ в качестве IgG1 мыши (mIgG1) оценивали на связывание с обогащенным ПСФ-тау и рекомбинантным тау дикого типа человека в формате ИФА. Это рекомбинантно полученное РТЗ сравнивали с очищенным РТЗ, полученным из гибридомы. Результаты продемонстрировали сравнимые кривые титрования связывания между партиями как очищенных гибридомных,

так и рекомбинантно полученных антител РТЗ (Фиг. 1). Сильное связывание присутствовало на ПСФ-тау, и минимальное связывание присутствовало на растворимом тау при более высоких концентрациях.

[00182] *Вестерн-блот*

[00183] Вестерн-блот анализ проводили с РТЗ против очищенного нефосфорилированного рекомбинантного тау человека и нерастворимого в саркозиле ПСФ-тау, полученного из головного мозга, пораженного БА. РТЗ продемонстрировало селективную реактивность с ПСФ-тау, сходную с фосфоселективными эталонными антителами АТ8 pS202/pT205/pS208 (Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84(3):265-72, 1992; Malia et al., *Proteins.* 84:427-434, 2016) и АТ100 pT212/pS214 (Mercken et al., 1992, *Id.*; Hoffmann et al., *Biochemistry.* 36(26):8114-24, 1997) (Фиг. 2). Фосфо-независимое эталонное антитело НТ7 (Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991) реагировало как с рекомбинантным тау, так и с ПСФ-тау. ВТ2, которое направлено на эпитоп, который является фосфо-чувствительным, реагировало только с рекомбинантным тау, не фосфорилированным в положениях S199/S202 (Mercken, 1991, *Id.*). В других экспериментах с вестерн-блоттингом РТЗ продемонстрировало слабую реактивность с рекомбинантным тау, даже если блоттинг в более высокой концентрации.

[00184] *Иммуногистохимическое исследование головного мозга человека*

[00185] Иммуногистохимический анализ выполняли на фиксированных формалином парафиновых срезах головного мозга, пораженного БА, и контрольного головного мозга, чтобы подтвердить реактивность с таупатией *in situ*. РТЗ продемонстрировало сходную, но более сильную картину реактивности, что и положительный контроль АТ8 для специфического эталонного таупатического диагностического антитела (Фиг. 3). В этих экспериментальных условиях не было обнаружено значительной реакции с нормальным тау в контрольном головном мозге (Фиг. 4).

[00186] *Иммуногистохимия у мышей дикого типа и тау-нокаутных мышей*

[00187] Анализ ИГС проводили с РТЗ в головном мозге мышей дикого типа и тау-нокаутных мышей. Анализ ИГС с РТЗ в головном мозге мыши дикого типа демонстрирует, что реактивность с

выбранным пулом тау дикого типа можно наблюдать в условиях оптимального сохранения эпитопа. Картина окрашивания РТЗ выявляет соматодентритическую локализацию (Фиг. 5, стрелка), напоминающую окрашивание, описанное в литературе для анти-фосфотау-антител, в тканях крысы и человека, полученных при биопсии (Matsuo et al., *Neuron*. 13(4):989–1002, 1994). Типичная картина нефосфоаксонального окрашивания для тау, наблюдаемая с антителом тау-1 (Фиг. 6, стрелка), отсутствует, что указывает на то, что РТЗ имеет ограниченную реактивность с физиологически важным пулом тау, связанным с микротрубочками. Отсутствие реактивности у животных, нокаутированных по тау, подтверждает тау-специфичность паттерна окрашивания РТЗ.

[00188] Присутствие фосфорилирования в эпитопе РТЗ (pT212/pT217, см. Пример 2) в головном мозге мыши дикого типа подтверждается обнаружением фосфорилирования у мышинных гомологов T212 и T217 в масс-спектрометрическом анализе, проведенном Morris et al. (*Nat Neurosci*. 18(8):1183–9, 2015). Это предполагает, что эпитоп РТЗ также будет присутствовать на ранней стадии фосфорилирования тау и образования агрегатов, что было бы предпочтительным для терапевтического эпитопа антител.

[00189] Оценка связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

[00190] Взаимодействия с ПСФ-тау и рекомбинантным тау оценивали с помощью SPR на приборах ProteOn (Bio-Rad, Геркулес, штат Калифорния) и Biacore (Biacore, Уппсала, Швеция) для РТ1 и РТЗ анти-ПСФ-тау-антител. Общее тау-антитело HT7 тестировали в качестве положительного контроля, а AT8 тестировали в качестве эталонного анти-ПСФ-тау-антитела.

[00191] В Таблицах 4 и 5 представлены репрезентативные результаты оценки аффинности антител с ПСФ-тау и рекомбинантным тау. Моноклональное антитело РТЗ показало очень сильное связывание с ПСФ-тау (Таблица 4).

[00192] Таблица 4. Аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR к гибридным и рекомбинантным mAb и Fab с ПСФ-тау

Название mAb/Fab	k_{on} (1/мс)	k_{off} (1/с)	K_D (нМ) ^a
mAb HT7	$(7,06 \pm 0,62) \times 10^5$	$(9,26 \pm 2,77) \times 10^{-5}$	131 ± 41
mAb РТ1 (гиб)	$2,01 \times 10^5$	$6,47 \times 10^{-5}$	322
mAb РТЗ (рек mG2a)	$(3,12 \pm 0,40) \times 10^6$	$< 5,0 \times 10^{-5}$	≤ 16
Fab РТЗ	$(1,83 \pm 0,08) \times 1$	$(1,15 \pm 0,02) \times 10^{-}$	63 ± 3

	0^6	4	
mAb AT8 (гиб)	$(2,30 \pm 0,19) \times 10^6$	$(2,11 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	92 ± 8
Fab AT8	$(8,89 \pm 0,87) \times 10^5$	$(2,30 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	$25,844 \pm 2,99$ 5

Для $n \geq 3$ повторностей, указано стандартное отклонение;

«гиб» – mAb, экспрессируемое гибридомой; «рек» – рекомбинантное mAb;

^a значения K_D в скобках было получено посредством исключения концентрации 75 нМ инъецированных mAb.

[00193] Кажущаяся аффинность связывания (K_D) рекомбинантного PT3-mG2a была равна или меньше 16 пМ с очень медленными скоростями диссоциации. Только одно очень слабое связывание с рекомбинантным тау наблюдалось для экспрессируемого гибридомой PT3 в одной из четырех повторностей (Таблица 5).

[00194] **Таблица 5:** Аффинности SPR Biacore к гибридным и рекомбинантным mAb и Fab с рекомбинантным тау

Название mAb/Fab	k_{on} (1/мс)	k_{off} (1/с)	K_D (пМ)
mAb HT7	$(3,86 \pm 2,00) \times 10^6$	$(1,18 \pm 0,54) \times 10^2$	$3,050 \pm 2,1$ 10
mAb PT1 (гиб)		Значимое связывание отсутствует ^a	
mAb PT3 (гиб)		Низкое связывание наблюдается только в 1 из 4 повторностей ^a	
mAb PT3 (рек mG2a)		Нет связывания	
Fab PT3		Нет связывания	
mAb AT8 (гиб)		Нет связывания ^a	

«гиб» – mAb, экспрессируемое гибридомой; «рек» – рекомбинантное;

^a Протестировано на ProteOn с рекомбинантным тау от Sigma-Aldrich (Сент Луис, штат Миссури) (0,12–75 нМ при 5-кратном разведении) которое позже было определено как агрегированное. Для всех других протестированных образцов на Biacore был использован собственный рекомбинантный тау.

[00195] Из-за мультимерной/агрегированной природы ПСФ-тау с множественными копиями эпитопа и двухвалентной природы IgG на аффинность моноклональных антител влияла авидность в этом формате исследования. Аффинность Fab предоставляет информацию о

внутренней аффинности антитела. Fab PT3 проявлял сильную внутреннюю аффинность связывания с ПСФ-тау (KD=63 пМ) и медленную скорость диссоциации (Таблица 4). Реакционная способность Fab с рекомбинантным тау в SPR Biacore была ниже предела обнаружения в условиях анализа (Таблица 5).

[00196] Характеристические исследования показали, что PT3 избирательно связывает ПСФ-тау и, что он обладает высокой аффинностью к ПСФ-тау, полученному из головного мозга, пораженного БА.

[00197] Пример 2 – Картирование эпитопа PT3

[00198] Эпитоп PT3 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (ProteOn) с панелью из фосфопептидов, приведенных в Таблице 6.

[00199] *Материалы и способы.* Fab PT3 (B187) был получен в виде химерной версии с мышинной вариабельной и константной областью человеческого IgG1/к с 6xHis-меткой на С-конце тяжелой цепи (VH10, SEQ ID NO: 25 и VL7, SEQ ID NO: 30). Fab получали путем временной экспрессии в клетках НЕК 293, очищали с помощью Ni-аффинной хроматографии и диализовали в 20 мМ Трис pH 7,4, 50 мМ NaCl (Sino Biologicals).

[00200] Аффинность связывания Fab PT3 с каждым из четырнадцати тау-фосфопептидов, представленных в Таблице 6, оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Bio-Rad ProteOn XPR36. Пептиды синтезировали стандартными химическими методами (New England Peptide) с биотином с короткой цепью и фрагментом PEG4 на N-конце. Биотинилированный пептид захватывали на покрытом нейтравидином биосенсорном чипе NLC, и Fab PT3 пропускали по поверхности для измерения кинетических параметров.

[00201] Все эксперименты проводились при 25°C с использованием фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, 0,005% Tween 20 (PBST) в качестве рабочего буфера и буфера для разведения образцов. Перед запуском образцов чип NLC кондиционировали, пропуская PBST по поверхности чипа в течение 1 часа. Приблизительно 5-10 RU пептида захватывали на поверхности чипа путем разбавления пептида до 10 нг/мл в PBST и инъекции через каналы потока при 30 мкл/мин в течение 100 с. Серийные разведения Fab PT3 (1,1-90 нМ) анализировали и, за исключением пептида-8, каждую концентрацию измеряли в двух повторностях. После захвата пептидов титрование антител вводили при 60 мкл/мин

в течение 3 минут (фаза ассоциации), за которой следуют 300 с только буфера (фаза диссоциации).

[00202] Данные дважды аппроксимировали путем вычитания отклика между точками и кривых, полученных путем инъекции только буфера. Поверхность чипа регенерировали, используя одну инъекцию 0,85% фосфорной кислоты при 30 мкл/мин в течение 100 с, времени контакта с последующими четырьмя инъекциями рабочего буфера перед следующей инъекцией титрования антител. Обработка данных и кинетический анализ проводились с использованием программного обеспечения прибора. Данные были проанализированы с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1.

[00203] *Результаты.* Кинетические константы скорости и равновесные аффинности связывания для Fab PT3 приведены в Таблице 6.

[00205] Таблица 6: Данные аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR для связывания Fab РТЗ

с пептидами

Название пептида	Фосфорилированные сайты	Последовательность***	Средн. KD (нМ)	Диапазон KD или STDEV (нМ)	Средн. ka (1/мс)	Диапазон ka или STDEV (1/мс)	Средн. kd (1/с)	Диапазон kd или STDEV (1/с)	Кол-во повторностей
Пептид-1	212/214/ 217	GTPGSRSR (pT) P (pS) LP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 47)	0,26	0,14–0,38	1,27 E+06	(0,87–1,67) E+06	2,80 E-04	(2,36–3,24) E-04	2
Пептид-2	212/217	GTPGSRSR (pT) PSLP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 48)	0,27	0,09–0,45	7,64 E+05	(5,46–9,82) E+05	1,68 E-04	(0,91–2,45) E-04	2
Пептид-3*	214/217	GTPGSRSRTP (pS) LP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 49)	5,57	1,64	1,04 E+06	2,83 E+06	5,47 E-03	1,77 E-04	3
Пептид-4	210/217	GTPGSR (pS) RTPSLP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 50)	6,60	6,48–6,71	9,68 E+05	(9,22–9,68) E+05	6,27 E-03	(6,19–6,27) E-03	2
Пептид-5	210/214/217	GTPGSR (pS) RTP (pS) LP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 51)	8,70	6,6–10,8	7,04 E+05	(5,45–8,63) E+05	5,84 E-03	(5,69–5,98) E-03	2
Пептид-6	217	GTPGSRSRTPSLP (pT) PPTREPKK (SEQ ID NO: 52)	11,4	10,9–11,9	5,41 E+05	(5,24–5,58) E+05	6,16 E-03	(6,06–6,25) E-03	2

Название пептида	Фосфорилированные сайты	Последовательность***	Средн. KD (нМ)	Диапазон KD или STDEV (нМ)	Средн. ka (1/мс)	Диапазон ka или STDEV (1/мс)	Средн. kd (1/с)	Диапазон kd или STDEV (1/с)	Кол-во повторностей
		ID NO: 52)				E+05		03	
Пептид-7	212/214	GTPGSRSR (pT) P (pS) LPTPPTREPCK (SEQ ID NO: 53)	13,5	11,3–15,7	4,22 E+05	(3,57–4,87) E+05	5,55 E-03	(5,49–5,60) E-03	2
Пептид-8**	212	GTPGSRSR (pT) PSLP TPPTREPCK (SEQ ID NO: 54)	23	Н/П	2,81 E+05	Н/П	6,46 E-03	Н/П	1
Пептид-9	214	GTPGSRSRTP (pS) LP TPPTREPCK (SEQ ID NO: 55)	> 500	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	1
Пептид-10	210/214	GTPGSR (pS) RTP (pS) LPTPPTREPCK (SEQ ID NO: 56)	>500	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2
Пептид-11#	208/212/214	SPGTPG (pS) RSR (pT) P (pS) LPTPPT (SEQ ID NO: 57)	Нет связывания	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	1
Пептид-12	210	GTPGSR (pS) RTPSLP TPPTREPCK (SEQ ID NO: 58)	Нет связывания	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2

Название пептида	Фосфорилированные сайты	Последовательность***	Средн. KD (нМ)	Диапазон KD или STDEV (нМ)	Средн. ka (1/мс)	Диапазон ka или STDEV (1/мс)	Средн. kd (1/с)	Диапазон kd или STDEV (1/с)	Кол-во повторностей
		ID NO: 58)	ия						
Пептид-13	214/220	GTPGSRSRTP (pS) LP TPP (pT) REPCK (SEQ ID NO: 59)	Нет связывания	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2
Пептид-С	отсутствует	GTPGSRSRTPSLPTPP TREPCK (SEQ ID NO: 60)	Нет связывания	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	4

Для n=2 указано значение диапазона;

* Для пептида-3, n=3, указано стандартное отклонение;

** Для пептида-8, n=1, не указано среднее или диапазон;

***Если не указано иное, все пептиды содержат остатки тау 204-225 (изоформа 2N4R) и содержат биотиновый фрагмент с короткой цепью (SCBiot) и dPEG4 на N-конце и амид на C-конце;

Пептид-11 содержит остатки тау 202-220 (изоформа 2N4R).

[00206] Fab PT3 показал наномолярное связывание с пептидами, фосфорилированными в T212 или T217, и связывание Fab PT3 было улучшено, когда и T212, и T217 были фосфорилированы. Fab PT3 лучше всего связывается с пептидами, содержащими pT212 и/или pT217. Fab PT3 связывается с аналогичной аффинностью с тау-пептидом, фосфорилированным в T212/T217 (пептид-2) и с тау-пептидом, фосфорилированным в T212/S214/T217 (пептид-1), демонстрируя, что дополнительное фосфорилирование в S214 не усиливает связывание Fab PT3. Fab PT3 имел очень слабое связывание с пептидом pS214-тау (пептид-9). Эффект связывания практически не наблюдался, когда S210 фосфорилировали отдельно или в комбинации с другими фосфорилированными остатками. Фосфорилирование в T220, по-видимому, способствует потере активности связывания для Fab PT3 (пептид-9 против пептида-13). Не обнаружено активности связывания для Fab PT3 против нефосфорилированного тау-пептида (пептид-C). PT3 связывается с фосфэпитопом в домене тау, богатом пролином.

[00207] Исследования связывания предполагают, что эпитоп PT3 содержит pT212 и pT217, и что эпитоп PT3 с максимальный связыванием содержит дважды фосфорилированный pT212/pT217-тау. Эпитоп PT3 отличается от других описанных эпитопов для фосфо-зависимых анти-тау-антител, таких как AT8 (pS202/pT205/pS208; Malia et al., 2016 *Id.*), AT180 (pT231; Goedert et al., *Biochemical J.* 301(Pt3):871-877), AT270 (pT181; Goedert et al., *Id.*), PHF1 (pS396/pS404; Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39(6):669-73, 1994), 12E8 (pS262; Seubert et al., *J Biol Chem.* 270(32):18917-22, 1995), анти-тау-антитело pS422 (Collin et al., *Brain.* 137(Pt 10):2834-46, 2014) и анти-тау-антитело pS409 (Lee et al., *Cell Rep.* 16(6):1690-700, 2016).

[00208] **Пример 3 – Кристаллическая структура пептидного комплекса Fab PT3+pT212/pT217-тау**

[00209] Совместные структуры Fab PT3 (B187) с двумя тау-фосфопептидами были определены с помощью рентгеновской кристаллографии, которая привела к идентификации эпитопа тау и паратопа PT3.

[00210] *Подготовка образцов и кристаллизация.* Пептиды для кристаллизации были синтезированы New England Peptides и имели следующие последовательности: Ac-GSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPT-OH (SEQ ID NO: 61) соответствует остаткам 207-220 тау-441 (изоформа 2N4R) фосфорилированному по остаткам T212, S214 и T217 (пептид

pT212/pS214/pT217-тау) и Ac-SR(pT)PSLP(pT)PPTRE-OH (SEQ ID NO: 62), соответствует остаткам 210-222 фосфорилированный в T212 и T217 (пептид pT212/pT217-тау). Леофилизированные пептиды растворяли в 100 мМ Трис, pH 8,5 до приблизительно 55 мг/мл.

[00211] Fab PT3 концентрировали до 19,64 или 17,76 мг/мл и смешивали с 10,7- или 9,3-кратным молярным избытком пептида pT212/pS214/pT217-тау или пептида pT212/pT217-тау, чтобы довести конечную концентрацию комплекса до 16,9 и 16,7 мг/мл в 20 мМ Трис, pH 7,5, 100 мМ или 50 мМ NaCl, соответственно. Кристаллизацию выполняли с использованием собственных сит и PEG (Qiagen) с использованием робота для кристаллизации Mosquito, смешивая 150 нл комплекс и 150 нл резервуарный раствор. Кристаллы для дифракции были получены в следующих условиях: пептидный комплекс Fab PT3+pT212/pS214/pT217-тау в 0,1 М ацетате pH 4,5, 18% ПЭГ 3350, 0,2 MgCl₂ и пептидный комплекс Fab PT3+pT212/pT217-тау в 20% ПЭГ 3350, 0,2 М фосфат аммония (одноосновный).

[00212] Сбор данных и определение структуры. Кристалл пептидного комплекса Fab PT3+pT212/pS214/pT217-тау был собран из 0,1 М ацетата pH 4,5, 18% ПЭГ 3350, 0,2 М MgCl₂ (маточный раствор) и смешан с раствором криопротектора, состоящим из маточного раствора с добавлением 20% глицерина. Кристалл был мгновенно охлажден в жидком азоте, и данные были собраны на микрофокусном рентгеновском генераторе Rigaku MicroMax™-007HF, оборудованном конфокальной оптикой Osmic™. VariMax™, детектором Saturn 944 CCD и криоохлаждающей системой X-stream™ 2000 (Rigaku).

[00213] Данные были обработаны с помощью XDS (Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010). Молекулярная замена была выполнена с фазером (McCoу et al., *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674, 2007) в комплекте программ PHENIX (Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010) с использованием Fab H3-23:L1-39 (PDB ID: 5I19) в качестве поисковой модели. При помощи Phenix.xtriage идентифицировали псевдомероздрическое двойникование в кристалле с 7% двойниковой фракции. Уточнение было выполнено с использованием двойной доработки для большинства моделей. Построение модели проводили с помощью Coot (Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004), а доработку осуществляли с помощью phenix.refine (Adams

et al., 2010, *Id.*). Последняя стадия уточнения была без двойного уточнения, так как позже было определено, что двойное уточнение не улучшило карты. Данные и уточнения статистики приведены в таблице 7.

[00214] **Таблица 7:** Рентгенографические данные и уточняющая статистика

	Пептидный комплекс Fab PT3+pT212/ps214/pT217- тау	Пептидный комплекс Fab PT3+pT212/pT217- тау
Пучок синхротронного излучения/детектор	Rigaku MicroMax-007HF/Saturn 944	APS IMCA-CAT/Pilatus 6M
<i>Данные</i>		
Длина волны (Å)	1,5418	1,000
Диапазон разрешения (Å)	30–2,5 (2,6–2,5)	8,94–2,0 (2,05–2,00)
Пространственная группа	C2	C2
Оси элементарных ячеек (Å)	125,21, 83,50, 167,41	126,24, 83,66, 166,87
Углы элементарных ячеек (°)	90,00, 91,71, 90,00	90,00, 92,50, 90,00
Молекулы/асимм. ячейка	3	3
V_m (Å ³ /Да)/раств. (%)	2,92/58	3,08/60
Полнота (%)	97,0 (89,3)	99,2 (99,6)
$R_{объединение}$	0,108 (0,318)	0,053 (0,555)
Среднее $I/\sigma(I)$	4,9 (1,7)	13,09 (2,49)
Кол-во измеренных отражений	177373 (11739)	384718 (27833)
Кол-во уникальных отражений	57942 (3878)	116430 (8607)
В-фактор (Уилсон) (Å ²)	29,1	36,49
<i>Статистика уточнения</i>		
Кол-во атомов	11165	10968
Кол-во молекул воды	961	779
$R_{раб}/R_{своб}$ (%)	19,4/23,1	18,6/21,3
Среднеквадратичные отклонения идеальной геометрии		
Длина связи (Å)	0,005	0,008
Углы связи (°)	1,005	1,215
Средние В-факторы (Å ²)	26,87	41,2
График Рамачандрана		

Остатки предпочтительных областях (%)	в 97,23	98,31
Остатки в разрешенных областях (%)	2,47	1,62
Отклоняющееся значение (%)	0,31	0,08

В скобках приведены Значения оболочки с самым высоким разрешением.

[00215] Монокристалл пептидного комплекса PT3 Fab+ α T212/ α T217- γ ау был извлечен из капли кристаллизации, погружен на несколько секунд в резервуарный раствор (20% ПЭГ 33500, 0,2 М фосфат аммония (одноосновный)) с добавлением 20% глицерина и мгновенно охлажден в жидком азоте. Данные были собраны на пучке синхротронного излучателя IMCA-CAT Advanced Photon Source 17-ID-B (Аргонн, штат Иллинойс) при 100 К. Интенсивности дифракции были собраны на детекторе Pilatus 6М при 180 ° оборотов со временем экспозиции 0,5 с на полградуса. Данные обрабатывались с помощью XDS (Kabsch, 2010, *Id.*) с максимальным разрешением 2,0. Å. Структура была определена путем молекулярной замены с помощью программы Phaser (McCoey et al., 2007, *Id.*) с использованием пептидной структуры Fab PT3+ α T212/ α S214/ α T217- γ ау в качестве модели поиска. Уточнение структуры было выполнено с помощью phenix.refine с использованием NCS (Adams et al., 2010, *Id.*). Корректировки модели проводились с использованием программы Coot (Emsley and Cowtan, 2004, *Id.*). Статистика сбора и уточнения рентгенографических данных приведена в Таблице 7. Межмолекулярные контактные расстояния были рассчитаны с помощью CONTACT (Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3, 1994) используя расстояние отсечки, равное 4,0 Å и проверяли визуально с помощью Rymol.

[00216] Структурный анализ. Структура PT3 Fab с пептидом α T212/ α S214/ α T217- γ ау была определена с разрешением 2,5 Å. Существует три копии комплекса на асимметричную единицу, как описано ниже для пептидной структуры Fab PT3+ α T212/ α T217- γ ау. Структура продемонстрировала, что PT3 не взаимодействует с фосфатом α S214, когда T212 и T217 также фосфорилированы (данные не показаны), что подтверждается картированием фосфопептидов ProteOn (Пример 2).

[00217] Структура Fab PT3 с пептидом α T212/ α T217- γ ау была

определена с помощью рентгеновской кристаллографии с разрешением 2,0 Å (Фиг. 7). В асимметричной единице есть три копии комплекса (копия 1: цепи А, С, Е; копия 2: цепи В, D, F; копия 3: цепи Н, L, Р), состоящие из тяжелых цепей А, С и Н, легких цепей В, D и L и пептидных цепей Е, F и Р. Три копии были очень похожи – переменные находились были в пределах 0,3 Å среднеквадратичного отклонения. На фиг. 7–8 представлены копии 3 (цепи Н, L, Р). Как видно на Фиг. 7, тяжелые и легкие цепи Fab образуют мелкий связывающий карман, а пептид оборачивается поперек Fab. Тау-фосфопептид имеет расширенную конформацию с характеристиками, соответствующими вторичной структуре спирали полипролина-II.

[00218] Остатки Fab PT3-паратоп и эпитоп пептида pT212/pT217-тау, которые составляют поверхность взаимодействия, представлены на Фиг. 8 и 9, а также в Таблице 8. Поверхность взаимодействия между PT3 и его эпитопным пептидом состоит из ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, которые простираются от пептидных остатков с 211 по 221. Структура Fab PT3 в комплексе с пептидом pT212/pT217-тау демонстрирует, что эпитоп содержит фосфаты pT212 и pT217. Гидроксильная группа Y32 тяжелой цепи образует важную водородную связь с кислородом фосфата pT212. Гидроксильная группа боковой цепи T28 (VH) также образует водородную связь с кислородом фосфата pT212. Тяжелая цепь K53 образует ключевое солевое мостиковое взаимодействие с pT217. Тяжелая цепь W99 образует гидрофобные взаимодействия с остатками боковой цепи L215 и P216 пептида. Остаток тяжелой цепи W104 имеет обширные взаимодействия с пептидом и также является частью интерфейса VH/VL. Легкая цепь Y32 образует гидрофобное взаимодействие с P219. Электростатические взаимодействия с фосфатами pT212 и pT217 имеют решающее значение для селективности PT3 в отношении фосфо-тау, а гидрофобные взаимодействия дополнительно способствуют высокой аффинности PT3 к pT212/pT217-тау (Пример 5) и ПСФ-тау (Примеры 1 и 6).

[00219] **Таблица 8:** Эпитоп и паратоп пептида Fab PT3+pT212/pT217-тау. Указаны остатки от VH или VL Fab PT3, которые взаимодействуют с пептидными остатками pT212/pT217-тау. Водородные связи обозначены жирным шрифтом.

V _H	Пептид	V _L
T28	R211	

F27, T28, S31, Y32	pT212	
S31	P213	
S31, K53	S214	
S31, Y32, K53, W99	L215	
W99, G100	P216	
S52, K53, W104	pT217	
W99, G100, G103, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91, D92, E93, F94, L96
	R221	D92, E93, F94

[00220] Пример 4 – человеческая каркасная адаптация для PT3

[00221] Анти-тау-антитело мыши PT3 гуманизировали с использованием метода человеческой каркасной адаптации (HFA) (Fransson et al., *J Mol Biol.* 398(2):214–31, 2010). Для человеческой каркасной адаптации были определены CDR в соответствии с Martin (Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263(5):800–15, 1996). Чтобы найти наилучшую комбинацию гуманизованного HC и LC, несколько последовательностей тяжелой и легкой V-областей человека были отобраны для тестирования. Четыре каркасных человеческих адаптированных переменных областей тяжелой цепи PT3 и четыре человеческих каркасных адаптированных переменных областей легкой цепи PT3 были сконструированы и получены в виде молекул полных человеческих тяжелых цепей IgG1 и каппа легкой цепи человека (Фиг. 10). Исходя из сходства последовательностей VH и VL PT3 мыши только в каркасных областях (FR), гены V зародышевой линии человека (4 для VH:IGHV3-23*01, IGHV3-33*01, IGHV3-11*01 и IGHV1-3*01; 4 для VL:IGVK1-16*01, IGVK1-16*01+, IGKV1-39*01 и IGKV2-24*01) были отобраны для производства вариантов VH и VL с адаптированными человеческими каркасами. VL78 (IGVK1-16*01+) представляет собой одноточечный мутант VL77 (IGVK1-16*01) и содержит мутацию D56S устраняющую потенциальный риск изомеризации. Названия 16 вариантов HFA моноклональных антител, полученных в результате объединения четырех молекул HFA HC и четырех молекул HFA LC, приведены в Таблице 9.

[00222] Таблица 9: Варианты HFA-PT3. B234 содержит мышинные родительские переменные области и был включен в качестве положительного контроля. Соответствующий ген зародышевой линии

человека указан в скобках. VL78 (IGVK1-16*01+) содержит одну точечную мутацию VL77 (IGVK1-16*01).

	VH10 (PT3) (SEQ ID NO:35)	VH91 (IGHV3- 23*01) (SEQ ID NO:36)	VH92 (IGHV3- 33*01) (SEQ ID NO:37)	VH93 (IGHV3- 11*01) (SEQ ID NO:38)	VH94 (IGHV1- 3*01) (SEQ ID NO:39)
VL7 (PT3) (SEQ ID NO:40)	B234				
VL77 (IGVK1-16*01) (SEQ ID NO:41)		B235	B296	B282	B268
VL78 (IGVK1-16*01+) (SEQ ID NO:42)		B250	B236	B297	B283
VL79 (IGKV1-39*01) (SEQ ID NO:43)		B265	B251	B237	B298
VL80 (IGKV2-24*01) (SEQ ID NO:44)		B280	B266	B252	B238

[00223] Клонирование и синтез ДНК для панели из 16 вариантов HFA-PT3 (hIgG1/κ) проводили стандартными методами. ДНК трансфицировали в клетки НЕК (Expi293) по стандартным протоколам, а супернатанты клеток собирали через 5 суток в культуре. Осветленный супернатант очищали с использованием Protein BioSolutions ProteinMaker (Гейтерсберг, штат Мэриленд) для высокопроизводительной параллельной очистки путем захвата IgG на смоле MabSelectSure Protein A, предварительно уравновешенной в 1x dPBS, pH 7,2. После промывки колонки 1x dPBS, pH 7,2, моноклональное антитело элюировали, используя 0,1 М ацетат натрия, pH 3,5. Фракции элюирования нейтрализовали путем добавления 2,5 М трис HCl, pH 7,2 до 20% по объему, и итоговой белковый состав представлял собой 0,08 М ацетат натрия, 0,5 М трис HCl, pH 7,1.

[00224] Первоначальная оценка панели HFA была основана на

выходе очистки, профиле высокоэффективной жидкостной хроматографии с исключением по размеру (эксклюзионная ВЭЖХ), связывании с ПСФ-тау в анализах связывания ИФА и биофизической характеристике.

[00225] Fab B296 (B324) и Fab B252 (B326) также создавали путем спаривания переменных областей HC и LC соответствующих моноклональных антител с константной областью человеческого IgG1/κ и меткой 6xHis на C-конце тяжелой цепи. B324 и B326 были экспрессированы в клетках HEK (Expi293) и очищены аналогичным способом, как описано (Zhao et al., *Protein Expr Purif.* 67(2):182–9, 2009).

[00226] Пример 5 – Характеристика антител к HFA-PT3 с помощью SPR на фосфопептидах

[00227] Подмножество вариантов моноклональных антител HFA-PT3, отобранных на основе биофизической характеристики и связывания ИФА с ПСФ, анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с ProteOn XPR36 для связывания со следующими фосфопептидами: пептид pT212/pT217-тау (пептид-2, SEQ ID NO: 48) и пептид pT212-тау (пептид-8, SEQ ID NO: 54). Все эксперименты проводили при 25 °C с использованием PBST, pH 7,4 (Кат. № Bio-Rad 176-2720) в качестве как рабочего буфера, так и буфера для разведения образца.

[00228] Связывание моноклональное антитело/пептид. После предварительного кондиционирования PBST, поверхность биосенсора была подготовлена путем покрытия чипа Biorad GLC анти-человеческим Fc (Jackson 109-005-098) до плотности приблизительно 6500 RU. Анти-человеческий IgG связывали амином с поверхностью чипа с использованием EDC/NHS, затем промывали этаноламином. Антитела разбавляли до 2 мкг/мл в PBST и инъецировали на поверхность в течение 5 мин при 30 мкл/мин до достижения максимальной плотности, равной 900–1000 RU. Пептиды вводили в виде аналитов при 60 мкл/мин в течение 3 минут с последующей диссоциацией в течение 5 минут. Пептид-2 разбавляли в PBST для получения трехкратного ряда концентраций (0–30 нМ) и измеряли в двух повторностях. Отдельные измерения связывания моноклональных антител с пептидом-8 регистрировали в диапазоне концентраций 0–100 нМ.

[00229] Связывание Fab/пептид. Биотинилированный пептид захватывали на покрытом нейтравидином биосенсорном чипе NLC, предварительно кондиционированном PBST, и Fab пропускали по

поверхности для измерения кинетических параметров. Приблизительно 5–10 RU пептида захватывали на поверхности чипа путем разбавления пептида до 10 нг/мл в PBST и инъекции через каналы потока при 30 мкл/мин в течение 100 с. Последовательные разведения Fab PT3 (от 1,1 нМ до 90 нМ) вводили со скоростью 60 мкл/мин в течение 3 минут (фаза ассоциации), а затем 300 с только буфера (фаза диссоциации).

[00230] Данные дважды аппроксимировали путем вычитания отклика между точками и кривых, полученных путем инъекции только буфера. Поверхность чипа регенерировали 0,85% фосфорной кислотой с последующей инъекцией PBST перед следующей инъекцией титрования антител. Обработка данных и анализ проводились с использованием программного обеспечения прибора. Данные были подобраны с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1.

[00231] Кинетические константы скорости и равновесные аффинности связывания для HFA-PT3 IgG к пептид-8 приведены в Таблице 10. B234 содержит переменные области мышиных PT3 и константные области IgG1/к человека. Среди гуманизированных вариантов B296 продемонстрировал наиболее сильное связывание с пептидом-8 (pT212- τ ay).

[00232] **Таблица 10:** Данные аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR для связывания панели mAb HFA-PT3 с пептидом-8

Образец	Описание белка	Средн. k_a (1/мс)	Средн. k_d (1/с)	Средн. K_D , нМ
B234	PT3 мыши, hIgG1	2,31E+06	8,02E-03	3,48
B235	VH91/VL77	Нет связывания		
B252	VH93/VL80	7,42E+05	2,42E-02	32,6
B280	VH91/VL80	2,18E+05	7,57E-03	34,7 (плохое соответствие данных)
B282	VH93/VL77	4,42E+05	3,82E-02	86,5
B296	VH92/VL77	8,56E+05	2,30E-02	26,8

n=2 для всех антител

[00233] Кинетические константы скорости и равновесные

аффинности связывания для HFA-PT3 IgG к пептид-2 приведены в Таблице 11. B252 и B296 показали наиболее сильное связывание с пептидом-2 (pT212/pT217-тау) со средними значениями K_D , равным 172 и 190 пМ, соответственно.

[00234] Таблица 11: Данные аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR для связывания панели mAb HFA-PT3 с пептидом-2

Образец	Описание белка	Средн. k_a (1/мс)	Интервал k_a	Средн. k_d (1/с)	Интервал k_d	Средн. K_D , пМ	Интервал K_D (пМ)
B234	PT3 мыши, hIgG1	9,35 E+06	(8,7– 10) E+06	3,25 E-04	(2,42– 4,08) E-04	29,2	(27,8– 30,6)
B235	VH91/VL77	3,21 E+06	(2,84– 3,58) E+06	5,69 E-03	(5,28– 6,10) E-03	1790	(1710– 1860)
B252	VH93/VL80	5,75 E+06	(3,95– 7,54) E+06	9,01 E-04	(8,56– 9,46) E-04	172	(126–217)
B280	VH91/VL80	4,71 E+06	(2,21– 7,20) E+06	2,74 E-03	(2,46– 3,01) E-03	769	(418– 1120)
B282	VH93/VL77	3,12 E+06	(2,34– 3,89) E+06	1,32 E-03	(1,24– 1,40) E-03	445	(360–529)
B296	VH92/VL77	5,00 E+06	(3,10– 6,90) E+06	8,26 E-04	(7,88– 8,63) E-04	190	(125–255)

n=2 для всех антител

[00235] Аффинность Fab B296 и B252 измеряли на пептиде pT212/pT217-тау (пептид-2) с помощью прибора ProteOn и сравнивали с родительским Fab B187 мыши (таблица 12). Наблюдалось увеличение в 2,7–5,1 раза по сравнению с Fab HFA и в 3,5–5,6 раза увеличение значений K_D по сравнению с родительскими Fab мыши. Fab B296 (B324) продемонстрировал более сильную аффинность к пептиду pT212/pT217-тау, чем Fab B252 (B326), а также более медленную скорость диссоциации.

[00236] Таблица 12: Данные аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR для связывания Fab HFA-PT3 с пептидом-2

Образец	Описание	Средн. k_a (1/мс)	Интервал k_a (1/мс)	Средн. k_d (1/с)	Интервал k_d (1/с)	Средн. K_D (нМ)	Интервал K_D (нМ)
B187	Родительский Fab мыши PT3	7,76 E+05	(4,91– 10,6) E+05	6,39 E-05	(4,93– 7,84) E-05	87,4	(73,8– 101)
B324	Fab B296	6,10 E+05	(4,27– 7,93) E+05	1,74 E-04	(1,61– 1,86) E-04	305	(234– 376)
B326	Fab B252	7,10 E+05	(5,07– 9,12) E+05	3,29 E-04	(3,04– 3,53) E-04	493	(387– 599)

n=2 для всех Fab

[00237] Пример 6 – Характеристика антител HFA-PT3 с помощью SPR на ПСФ-тау и рекомбинантном тау

[00238] Подгруппа моноклональных антител HFA-PT3 была протестирована на связывание с ПСФ-тау, выделенным из головного мозга, пораженного болезнью Альцгеймера. Все взаимодействия исследовали при температуре 25 ° С с использованием PBS, pH 7,4, с прибавлением 3 мМ ЭДТК, и 0,005% Tween 20 в качестве подвижного или системного буфера. В качестве положительного контроля использовали HT7 (Кат. Pierce № MN1000), мышинное анти-тау-антитело.

[00239] Взаимодействие моноклональных анти-ПСФ-тау-антител анализировали с помощью ProteOn с использованием поверхности биосенсора, полученного путем захвата-связывания ПСФ-тау с использованием HT7 в качестве реагента захвата. ПСФ-тау получали посредством 2-кратного центрифугирования при 5000 × g при 5°C в течение 10 минут; супернатант из второго центрифугирования затем разбавляли 1/40 в рабочем буфере. Для приготовления чипа HT7 был ковалентно иммобилизован на поверхности сенсорного чипа GLC (ProteOn) с использованием инструкций производителя по химии аминной связи (~ 5000 единиц ответа (RU)). Буфер соединения представлял собой 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5. После иммобилизации HT7 ПСФ-тау инъецировали и захватывали (~300 RU) HT7. После захвата ПСФ-тау ковалентно иммобилизовывали на ИС

сенсора посредством активации ИС, следуя всем инструкциям производителя в отношении химии соединения аминов. Оставшиеся реактивные сайты блокировали путем инъекции этаноламина. После приготовления и стабилизации поверхности, модифицированной ПСФ-тау, и поверхности сравнения (не содержащей антигена), анти-ПСФ-тау-антитела разводили в подвижном буфере и инъецировали в раствор (0,12–75 нМ в 5-кратных разведениях). Ассоциацию контролировали в течение 3 минут (120 мкл инъецировали при скорости 40 мкл/мин). Диссоциацию контролировали в течение 15 минут. Регенерацию поверхности сенсора проводили с использованием 10 мМ Gly, pH 2,0. Данные для моноклональных антител были подобраны с использованием модели двухвалентного связывания, где явная аффинность (K_D) сообщалась как отношение k_{off}/k_{on} . Модель связывания Ленгмюра 1:1 использовали для анализа кинетики Fab.

[00240] Большинство моноклональных антител НФА сохраняли такое же тесное связывание, что и мышинные родительские моноклональные антитела РТЗ, в диапазоне 27–165 пМ (Таблица 13). В252 и В296, два верхних моноклональных антитела НФА, имели аффинности 32 и 27 пМ, соответственно. В235 показал самую слабую аффинность к моноклональным антителам (165 пМ) из этой панели. В324 (Fab из В296) и В326 (Fab из В252) были оценены на связывание ПСФ-тау и показали в 2,5 и 3,3 раза более слабую K_D , соответственно, чем у Fab В187 родительского РТЗ мыши. В324 продемонстрировал в 1,3 раза более сильную аффинность (K_D) и в 1,7 раза более медленную диссоциацию, чем В326. Аффинности Fab были слабее, чем у соответствующего моноклонального антитела, что указывает на авидность моноклонального антитела по отношению к ПСФ-тау. В352, IgG4-вариант В296 с такими же переменными областями, также тестировали на связывание с ПСФ-тау, и аффинность (43 пМ) была в 2 раза выше, чем у В296 (Таблица 11).

[00241] **Таблица 13:** Аффинности, полученные на приборе ProteOn SPR для РТЗ НФА mAb и Fab с ПСФ-тау

Образцы	Описание	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (пМ)
НТ7	мышь (+ контр)	(5,69±0,99) E+05	(1,10±0,18) E-04	193±46
В17 (mAb)	РТЗ мыши, muG2a	(2,48±0,20) E+06	(2,68±0,43) E-05	11±1,9

B234 (mAb)	PT3 мыши, hIgG1	(2,23±0,13) E+06	(2,71±0,17) E-05	12±1,0
B235 (mAb)	VH91/VL77	(4,90±0,34) E+05	(8,06±0,24) E-05	165±12
B252 (mAb)	VH93/VL80	(1,32±0,09) E+06	(4,28±0,19) E-05	32±2,6
B280 (mAb)	VH91/VL80	(1,02±0,03) E+06	(5,63±0,28) E-05	55±3,3
B282 (mAb)	VH93/VL77	(6,65±0,09) E+05	(4,08±0,25) E-05	61±3,9
B296 (mAb)	VH92/VL77	(1,07±0,02) E+06	(2,93±0,19) E-05	27±1,8
B297 (mAb)	VH93/VL78	(1,44±0,07) E+06	(6,03±0,32) E-05	42±3,0
B187 (Fab)	Fab PT3	(1,67±0,05) E+06	(1,13±0,04) E-05	68±3
B326 (Fab)	Fab B252	(1,02±0,05) E+06	(2,30±0,04) E-04	224±12
B324 (Fab)	Fab B296	(8,16±0,45) E+05	(1,36±0,06) E-04	167±12
B352 (mAb IgG4)	B296 в качестве hIgG4	(2,55±0,56) E+05	(1,11±0,54) E-05	43±23

mAb: n=2 с 3 повторностями в каждом эксперименте

Fab: n=2 с 2 повторностями в каждом эксперименте

B352: n=2 с 4 повторностями в каждом эксперименте

[00242] Взаимодействие моноклональных анти-тау-антител и Fab с рекомбинантно экспрессируемым контрольным тау (человеческая изоформа тау 2N4R 441 aa, N-концевая 6xHis-метка, SEQ ID NO: 63) был изучен с Biacore T200. Поверхность биосенсора была подготовлена путем присоединения специфического античеловеческого Fc к IgG или антитела к анти-Fd к поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием инструкций производителя по химии связывания амина (~ 6500 единиц ответа (RU)). Буфер соединения представлял собой 10 mM ацетата натрия, pH 4,5. Анти-тау-антитела разводили в рабочем буфере и вводили для получения захвата, равного по меньшей мере 5 RU. После захвата моноклональных анти-тау-антител или Fab вводили рекомбинантно

экспрессированный контрольный тау в растворе (от 0,12 до 75 нМ в 5-кратных разведениях). Ассоциацию контролировали в течение 3 минут (150 мкл инъецировали при скорости 50 мкл/мин). Диссоциацию контролировали до тех пор, пока не наблюдалось снижение сигнала, по меньшей мере, на 5% для разумного определения скорости диссоциации. Регенерацию поверхности сенсора осуществляли с помощью 0,85% фосфорной кислоты с последующим добавлением 50 мМ NaOH. Данные как для моноклональных антител, так и для Fab были подобраны с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1, если наблюдалось связывание.

[00243] Ни B324, ни B326 не показали значительного связывания с контрольным тау. B296 также не показал связывания с контрольным тау.

[00244] Пример 7 – Кристаллическая структура пептидного комплекса B324+pT212/pT217-тау

[00245] Совместная структура B324 с пептидом pT212/pT217-тау (SEQ ID NO: 62) была определена с помощью рентгеновской кристаллографии, которая привела к идентификации эпитопа тау и паратопа B324 (и B296).

[00246] *Подготовка образцов и кристаллизация.* B324, который представляет собой Fab B296 с VH92 и VL77, был получен путем временной экспрессии в клетках HEK 293 и очищен с помощью Ni-аффинной хроматографии, SEC и ионного обмена в конечном буфере 20 мМ MES, pH 6,0, 0,2 М NaCl пептид pT212/pT217-тау (SEQ ID NO: 62), описанный в Примере 3, использовался для совместной кристаллизации. Для получения пептидного комплекса Fab+pT212/pT217-тау B324 добавляли 10-кратный молярный избыток пептида.

[00247] Кристаллизацию пептида B324 Fab+pT212/pT217-тау проводили при 9–18 мг/мл в 20 мМ MES, pH 6,0, 0,2 М NaCl. Первоначальный скрининг кристаллизации проводили с помощью робота для кристаллизации Mosquito методом диффузии паров сидячей капли при 20 °C с использованием двух внутренних сит и PEG (Qiagen). Появились кристаллы из 0,1 М ацетата натрия, pH 4,6, 20% ПЭГ 10К, и «семена» были получены путем механической гомогенизации с использованием набора Sead Bead (Hampton Research) для использования при дальнейшей оптимизации скрининга.

[00248] *Сбор данных и определение структуры.* Появились

кристаллы из 0,1 М ацетата натрия, pH 5,5, 37% ПЭГ 200, и их собирали и подвергали мгновенному охлаждению в жидком азоте без криозащиты для сбора данных дифракции рентгеновских лучей. Данные кристаллографии были собраны на пучке синхротронного излучателя IMCA-CAT Advanced Photon Source 17-ID-B (Аргонн, штат Иллинойс) при 100 К. Интенсивности дифракции были собраны на детекторе Pilatus 6М при 180 ° оборотов с экспозицией 0,5 с на полградуса. Данные обрабатывались с помощью XDS (Kabsch, 2010, *Id.*) с максимальным разрешением 2,6. Å. Рентгеновская кристаллическая структура B324 в комплексе с пептидом pT212/pT217-тау была решена путем молекулярной замены на Phaser (McCoу et al., 2007, *Id.*) с использованием связанной структуры Fab в качестве поисковой модели и уточнена с помощью Refmac (Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997) (Таблица 14). Межмолекулярные контактные расстояния были рассчитаны с помощью CONTACT (Collaborative Computational Project, 1994, *Id.*) используя расстояние отсечки, равное 4,0 Å и проверяли визуально с помощью Rutil.

[00249] Таблица 14: Данные рентгеноструктурного анализа

сбор данных	
Содержание	Пептид B324+pT212/pT217-тау
маточный раствор	0,1 М NaAct 5,5, 37% ПЭГ 200
При низких температурах	отсутствует
Источник/Детектор	APS IMCA-CAT 17ID-B/Pilatus 6М
Длина волны (Å)	1,000
Температура (К)	100
Расстояние (мм)	450
Общее вращение (°)	180 **
Эксп. (сек) / 0,5°	0,5
Пространственная группа	I222
Оси элементарной ячейки (Å)	97,60, 104,43, 133,35
Углы элементарной ячейки (°)	90, 90, 90
Молекулы/асимм. ячейка	1
V _m (Å ³ /Да) /раств. (%)	3,43/64
Разрешение (Å)	30-2,6 (2,67-2,60)

Число измеряемых отражений	113798	(6597)
Число уникальных отражений	21019	(1367)
Полнота (%)	98,6	(87,6)
Избыток	5,4	(4,8)
R-объединение	0,040	(0,417)
$\langle I/\sigma \rangle$ (несред.)	10,8	(1,1)
$\langle I/\sigma \rangle$ (сред.)	24,5	(3,5)
B-фактор (Уилсон) ($\text{\AA}^2$)	69,4	
<i>Статистика уточнения</i>		
Кол-во атомов	3331	
$R_{\text{раб}}/R_{\text{своб}}$	0,230/0,265	
Среднеквадратичное значение от идеальной геометрии		
Длина связи ($\text{\AA}$)	0,005	
Углы связи ($^\circ$)	1,027	
Средние B-факторы ($\text{\AA}^2$)	96,2	
График Рамачандрана		
Остатки в избранных областях (%)		
	95,14%	
Остатки в доступных областях (%)		
	3,94%	
Отклоняющееся значение (%)	0,93%	
В скобках приведены значения оболочки с самым высоким разрешением.		

[00250] *Структурный анализ.* Общая структура взаимодействия пептидов B324+pT212/pT217-тау представлена на Фиг. 11. Пептид pT212/pT217-тау входит в бороздку, образованную на границе поверхности взаимодействия VH и VL B324. Поверхность взаимодействия между B324 и пептидом pT212/pT217-тау состоит из ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, которые простираются от пептидных остатков с 211 по 221 (Фиг. 12). Следующие CDR участвуют в прямом связывании с пептидом pT212/pT217-тау: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L3.

Структура В324 в комплексе с пептидом рТ212/рТ217-тау демонстрирует, что эпитоп содержит фосфаты рТ212 и рТ217. Схема взаимодействующих остатков Fab В324 и пептидных остатков рТ212/рТ217-тау представлена на Фиг. 13. Некоторые из ключевых взаимодействий являются следующими: гидроксильная группа VH Y32 и гидроксильная группа VH T28, каждая, образуют водородные связи с различными атомами кислорода фосфата рТ212; существуют гидрофобные взаимодействия от боковых цепей VH Y32 и VH W99 до метильных групп L215 тау-пептида; VH K53 образует взаимодействие солевого мостика с остатком рТ217 тау-пептида; боковая цепь VH W104 образует гидрофобное взаимодействие с метильной группой рТ217 и взаимодействие стека СН-π с Р218 и является частью поверхности взаимодействия VH/VL; индольный амид VH W104 образует водородную связь с гидроксилом боковой цепи T220; существует гидрофобное взаимодействие между боковой цепью VL Y32 и Р219; существует гидрофобное взаимодействие между VL L96 и метильной группой T220; и гидрофобное взаимодействие образуется боковой цепью VL F94 и метильной группой T220. Электростатические взаимодействия с фосфатами рТ212 и рТ217 имеют решающее значение для селективности В324 в отношении фосфо-тау, а гидрофобные взаимодействия дополнительно вносят вклад в высокую аффинность В324 к пептиду рТ212/рТ217-тау (Пример 5) и ПСФ-тау (Пример 6). Эпитоп и паратоп РТ3 и В324 мыши очень похожи, что указывает на то, что ни эпитоп, ни паратоп значительно не изменяются после гуманизации (Фиг. 9 и 13, Таблицы 8 и 15).

[00251] Таблица 15: Эпитоп и паратоп пептида В324+рТ212/рТ217-тау. Указаны остатки от VH или VL В324, которые взаимодействуют с пептидными остатками рТ212/рТ217-тау. Водородные связи обозначены жирным шрифтом.

VH	Пептид	VL
G26, T28	R211	
F27, T28 , S31, Y32	рТ212	
S31	P213	
S31	S214	
S31 , Y32, K53 , W99	L215	
K53, W99, G100	P216	
S52, K53 , W104	рТ217	

G100, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91, D92, E93, F94, L96
	R221	D92, E93, F94

[00252] Пример 8 – функциональное тестирование в клеточных анализах

[00253] PT3 тестировали на ингибирование образования «семян» тау в двух типах клеточных анализов: анализы совместной инкубации и анализы истощения. Оба типа анализа используют клетки HEK, экспрессирующие два фрагментированных хромофором тау-фрагмента K18, которые генерируют сигнал в непосредственной близости, например, из-за агрегации. Когда клетки обрабатывают «семенами» агрегированного и фосфорилированного полноразмерного тау, полученного из разных источников, индуцируется агрегат K18, который можно определить количественно путем изменения отношения передачи энергии биолюминесцентного резонанса (BRET) (т.е. анализа BRET) или путем подсчета флуоресцентного резонансного переноса энергии клетки (FRET) с использованием флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) (то есть, анализа FRET; Фиг. 14) (Holmes et al., 2014, PNAS 111(41):E4376–85).

[00254] Анализ совместной инкубации гомогенатов клеток HEK (анализ BRET)

[00255] Гомогенаты, содержащие «семена» тау для совместной инкубации, получали из стабильной клеточной линии HEK со сверхэкспрессией GFP-тауP301L, которая содержит K18-индуцированный агрегированный полноразмерный тау с GFP-меткой. Клетками-реципиентами были клетки HEK, стабильно экспрессирующие K18/P301L-NanoLuc и K18/P301L-HaloTag. «Семена» тау совместно инкубировали с тестируемым антителом и получающими хромофор-K18-содержащими клетками HEK в течение 72 часов. Образование агрегатов K18 измеряли по изменению отношения BRET (590 нм/450 нм). PT3 блокировал индукцию агрегатов на 46,97% при 300 нМ, на 18,02% при 30 нМ и на 12,57% при 3 нМ (Фиг. 15).

[00256] Анализ совместной инкубации спинного мозга (анализ FRET)

[00257] Гомогенаты, содержащие «семена» тау для совместной инкубации, были получены из спинного мозга трансгенных животных P301S в возрасте от 22 до 23 недель, который содержит агрегированный трансгенный тау человека. Для повышения

чувствительности клетки-реципиенты, использованные в анализе, представляли собой клетки НЕК, стабильно экспрессирующие K18/P301S-YFP и K18/P301S-CFP. «Семена» тау совместно инкубировали с тестируемым антителом и получающими хромофор-K18-содержащие клетки НЕК в течение 72 часов. Образование агрегатов K18 измеряли путем подсчета FRET-позитивных клеток с помощью FACS. PT3 блокировал индукцию агрегатов на 34,03% при 300 нМ, на 37,02% при 30 нМ и на 30,68% при 3 нМ (Фиг. 16).

[00258] *Клеточные анализы иммунодеплеции*

[00259] Чтобы выяснить, связано ли максимальное процентное значение ингибирования с плотностью эпитопов на «семенах» или с количеством «семян», которые содержат эпитоп PT3, были проведены анализы иммунодеплеции. В анализах иммунодеплеции «семена» тау инкубировали с тестируемым антителом и удаляли из раствора с помощью шариков белка G. Истощенный супернатант тестировали на остаточную посевную способность в клетках НЕК, содержащих хромофор-K18, и анализировали с помощью FACS, как описано ранее (Holmes et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(41):E4376-85, 2014).

[00260] Гомогенаты, содержащие «семена» тау для иммунодеплеции, были получены из спинного мозга трансгенных животных P301S в возрасте от 22 до 23 недель (Фиг. 17) или из криоконсервированной ткани головного мозга человека, пораженного БА (Фиг. 18). В анализе иммунодеплеции головного мозга человека, пораженного БА, супернатант после истощения тестировали в присутствии реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 для получения приемлемого окна анализа. Посев тау может быть почти полностью (> 90%) истощен PT3 как в экстрактах спинного мозга, так и в общих гомогенатах головного мозга человека, пораженного БА (Фиг. 17 и 18).

[00261] *Результаты*

[00262] PT3 ингибировал «семена» тау, полученные как из лизатов клеток НЕК, так и из лизатов спинного мозга TgP301S. Максимальное ингибирование, полученное в анализах, варьировало для разных анти-фосфо-тау-антител и для разных «семян» (Таблица 16). Наблюдаемые значения ингибирования для PT3 при 300 нМ составили $46,97 \pm 5,87\%$ для «семян» НЕК-клеток и $34,03 \pm 2,05\%$ для экстрактов спинного мозга TgP301S. Различные максимальные значения ингибирования для фосфо-тау-антител в различных клеточных анализах могут указывать на различия в статусе

фосфорилирования используемых «семян» тау. «Семена» тау, полученные в спинном мозге TgP301S, имеют нейронное происхождение и, как ожидается, будут иметь большее сходство с ПСФ-тау, чем «семена» тау из клеток НЕК, и это может объяснить в целом более высокую эффективность, наблюдаемую с использованием фосфо-тау антител против экстрактов спинного мозга по сравнению с лизатами НЕК клеток.

[00263] Образование «семян» тау может быть почти полностью истощено с помощью РТЗ как в экстрактах спинного мозга, так и в общих гомогенатах головного мозга человека, пораженного БА, и этот результат свидетельствует о том, что отсутствие полного ингибирования в экспериментах по совместной инкубации с посевным материалом спинного мозга не было результатом присутствия «семян», лишенных РТЗ-эпитопов, а скорее из-за ограниченной плотности эпитопов на «семенах».

[00264] **Таблица 16:** Краткое изложение результатов функционального тестирования в клеточных анализах

mAb	Анализ совместной инкубации BRET/GFP-тауP301L	Анализ совместной инкубации спинного мозга FRET/P301S	Анализ иммунодеплеции спинного мозга FRET/P301S	Анализ иммунодеплеции FRET/гомогенат головного мозга человека, пораженного БА
РТЗ	46,97±5,87	34,03 ± 2,05	96,24 ± 0,43	92,24±2,30
АТ8	10,52±9,48	26,4±1,74	96,71±0,42	80,69±5,79
НТ7	65,44 ± 1,08 ^a	73,51 ± 1,78 ^b	99,16±0,21	82,99 ± 0,68

Единица измерения –% отрицательного контроля, среднее значение различных экспериментов; концентрация антител во всех анализах составляла 300 нМ, за исключением ^aингибирования при 166,67 нМ и ^bингибирования при 89,99 нМ.

[00265] Механизм действия для терапии антителами к тау все еще является предметом дискуссий, и было предложено множество механизмов. Опосредованный антителами клиренс внеклеточных «семян» микроглиальными клетками недавно был предложен в качестве одного из доминирующих механизмов действия (Funk et al., *J Biol Chem.* 290(35):21652–62, 2015 и McEwan et al., 2017, *PNAS* 114:574–9). В этом контексте иммунодеплецию посевного материала, полученного из головного мозга человека, можно считать наиболее трансляционным клеточным результатом, а высокая эффективность родительского мышинного антитела РТЗ в этом типе

клеточного анализа позволяет предположить, что НФА-версии РТЗ будут эффективными терапевтическими средствами.

[00266] Пример 9. Эффективность *in vivo* РТЗ мыши на модели инъекции оПСФ

[00267] Для оценки эффективности антител к тау *in vivo*, мыши с патологией тау головного мозга являются важными модельными системами. (Julien et al., *Methods Mol Biol.* 849:473–91, 2012). Некоторые из этих моделей были описаны, и их обычно можно разделить на три группы: 1) тау-трансгенные мыши со сверхэкспрессией ДТ или мутантного тау (например, Р301L или Р301S) тау с мутантами с тяжелой патологией через 5–9 месяцев, в зависимости от штамма (Allen et al., *J Neurosci.* 22(21):9340–51, 2002; Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250–7, 2010; Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963–73, 2005; Yoshiyama et al., *Neuron.* 53(3):337–51, 2007); 2) мыши с пространственно-временной регуляцией экспрессии мутантного тау (например, Р301L) (Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4):610–20, 2012) или проагрегирующего фрагмента (например, К18) (Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737–48, 2008); и 3) мыши с экспрессией как мутантного тау, так и АРР, проявляющего патологии бляшек и тау (Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053–63, 2007).

[00268] В то время как у мышей, экспрессирующих мутантный тау, развивается сильная патология, возникновение патологии может варьировать между животными, вызывая вариабельность в исследованиях, а относительный вклад клеточно-автономной агрегации тау и распространения в общий сигнал агрегации тау неясен. Следовательно, модели, которые можно использовать для эффективного изучения образования «семян» и распространения тау (например, de Calignon et al., 2012, *Neuron.* 73(4):685–97, 2012; Liu et al., *Id.*) относятся к высокому уровню. Трансляционная ценность таких моделей еще более усиливается благодаря обнаружению того факта, что инъекция мышам ALZ17 (штамма, экспрессирующего нормальный тау человека) с гомогенатами головного мозга при разных таупатиях, вызывает образование тау-включений с морфологией, которая напоминает таупатию в головном мозге человека. Например, инъекция мышам материала из образцов болезни аргиофильных зерен привела к отложениям со сфероидальной или подобной запятой структурой, характерной для самого заболевания, и БА-подобная патология тау наблюдалась у мышей, которым инъецировали материал БА (Clavaguera et al.,

2013, PNAS 110(23):9535-40).

[00269] Таким образом, была создана модель инъекции трансгенной мыши P301L, в которой проагрегирующий фрагмент тау, такой как синтетические фибриллы K18 (Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006) или «семена» ПСФ-тау, полученные из головного мозга человека, пораженного БА, вводили в кортикальные или гиппокампальные области моделей трансгенных мышей P301L в возрасте, когда клеточно-автономная агрегация еще не началась. Инъекционная модель имеет целью имитировать критический внеклеточный компонент распространения «семян» тау. Инъектированные «семена» K18 или ПСФ-тау вызывают таупатию в месте инъекции и, в меньшей степени, в соединенной контралатеральной области (Peeraer et al., *Neurobiol Dis*. 73:83-95, 2015). Эта модель позволяет тестировать потенциал антител против образования «семян», таких как анти-тау-антитела по изобретению, при совместной инъекции с «семенами» ПСФ-тау, полученными из мозга, пораженного БА, или фибриллами K18 (Iba et al., 2015, *J Neurosci*. 33(3):1024-37, 2013; Iba et al., *Acta Neuropathol*. 130(3):349-62).

[00270] Схема модели инъекции трансгенной мыши P301L показана на фиг. 19. Вкратце, кортикальная инъекция нерастворимой в саркозиде полученной после смерти фракции головного мозга, пораженного БА, вызывает медленное прогрессирующее повышение агрегации тау. В инъектированном полушарии первые сигналы измеряли через 1 месяц после инъекции и наблюдался прогресс через 3 месяца после инъекции. Через пять месяцев после инъекции у некоторых животных начинают образовывать клубки, вызванные мутацией P301L (Terwel et al., 2005, *Id.*). Уровни окрашивания AT8 увеличиваются между 1 и 3 месяцами (Фиг. 19C-D и 19E-F), поэтому эксперименты по оценке эффективности антител анализировали через 2 месяца после совместной инъекции. Кроме того, инъекция в гиппокамп нерастворимой в саркозиде полученной после смерти фракции головного мозга, пораженного БА, вызывает дозозависимое прогрессирующее увеличение агрегации тау, измеренное с помощью анализа MesoScale Discoveries (MSD) нерастворимых в саркозиде фракций из инъектированных полушарий (Фиг. 19G).

[00271] Лечение животных и внутривенные инъекции

[00272] Для инъекционных исследований трансгенных мышей тау-P301L, экспрессирующих самую длинную изоформу тау человека с

мутацией P301L (тау-4R/2N-P301L) (Terwel et al., 2005, *Id.*) были использованы для операции в возрасте 3 месяцев. Все эксперименты проводились в соответствии с протоколами, утвержденными местным этическим комитетом. Для стереотаксической хирургии мыши получали одностороннюю (правое полушарие) инъекцию в кору (AP +2,0, ML +2,0 от брегмы, DV, 2,7 мм от твердой мозговой оболочки) или гиппокамп (AP -2,0, ML +2,0 (от брегмы), DV 1,8 мм (от твердой мозговой оболочки)) 3 мкл (скорость 0,25 мкл/мин) нерастворимого в саркозиле полученного после смерти препарата из ткани, пораженной БА (обогащенные парные спиральные филаменты, оПСФ) в присутствии или отсутствии моноклональных антител. В случае внутрибрюшинных (в/б) инъекций антител или физиологического раствора, лечение (20 мг/кг, 2 раза в неделю) начинали за 1 неделю до внутричерепной инъекции и продолжали до тех пор, пока мышей не умерщвляли для вскрытия (2 месяца после внутричерепной инъекции).

[00273] Процедура извлечения

[00274] Ткань мыши из инъектированного полушария взвешивали и гомогенизировали в 6 объемах буфера для гомогенизации (10 mM Трис-HCl (pH 7,6). Гомогенат центрифугировали при $27000 \times g$ в течение 20 минут, и после взятия аликвоты из полученного супернатанта (общий гомогенат) добавляли 1% N-лауроилсаркозин. Через 90 минут (900 об/мин, 37 °C) растворы снова центрифугировали при $184000 \times g$ в течение 1 часа. Супернатанты хранили в виде растворимой в саркозиле фракции, тогда как осадок, содержащий нерастворимый в саркозиле материал, ресуспендировали в буфере для гомогенизации.

[00275] Биохимический анализ

[00276] Покрывающее антитело (либо анти-AT8-антитело, либо антитело к общему тау) разводили в PBS (1 мкг/мл) и делили на аликвоты в чашках MSD (30 мкл на лунку) (L15XA, Mesoscale Discoveries), которые инкубировали в течение ночи при 4 °C. После промывания 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20 планшеты блокировали 0,1% казеином в PBS и снова промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20. После добавления образцов и стандартов (оба разбавленных в 0,1% казеине в PBS) планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °C. Затем планшеты промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20 и добавляли антитело, конъюгированное с SULFO-TAG™, в 0,1% казеине в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при этом раскручивая при 600 об/мин. После

заключительной промывки (5 × 200 мкл PBS/0,5% Tween-20) добавляли 150 мкл 2 × буфера Т и планшеты считывали с помощью визуализатора MSD. Необработанные сигналы были нормализованы по стандартной кривой, состоящей из 16 разведений нерастворимого в саркозиле полученного после смерти препарата из головного мозга, пораженного БА (ePHF), и были выражены в произвольных единицах (AU) оПСФ. Статистический анализ (ANOVA с пост-тестом Бонферрони) выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

[00277] Результаты

[00278] Активность РТЗ мыши в модели совместной инъекции коры (Фиг. 19) была подтверждена в четырех независимых исследованиях. Мышам вводили периферическую дозу в соответствии с Таблицей 17, и результаты показаны на Фиг. 20. Дальнейшее улучшение модели (Фиг. 19D) позволило снизить дозу оПСФ-тау и дозу совместно введенного антитела, как показано в таблице 18, с результатами, показанными на Фиг. 21. Используя эту более низкую дозу оПСФ-тау, было также обнаружено, что РТЗ оказывает существенное влияние на снижение агрегированной тау при периферическом введении ($P < 0,0001$; Фиг. 21).

Таблица 17: Периферийное дозирование

Группа	Количество пмоль оПСФ	Количество пмоль совместной инъекции антитела	Антитело, в/б	n
IgG	0,2	5	20 мг/кг (2х/мас.)	12
РТЗ	0,2	–	20 мг/кг (2х/мас.)	13
РТЗ	0,2	5		5

Таблица 18: Дозирование при совместной инъекции

Группа	Количество пмоль оПСФ	Количество пмоль совместной инъекции антитела	n
IgG	0,2	5	14
РТЗ	0,2	5	15
РТЗ	0,2	0,5	15
РТЗ	0,2	0,05	15

[00279] Совместная инъекция изотипов ePHF и РТЗ, включая вариант IgG2a РТЗ-НФА (который содержит вариabельные области

VH92 (SEQ ID NO: 27) и VL77 (SEQ ID NO: 31) в константных областях mIgG2a/каппа) в соответствии со схемой на Фиг. 19А, ослабляла ePHF-индуцированную агрегацию тау у мышей P301L (Фиг. 22). Инъекции проводили в кору. (не в гиппокамп). Эффект наблюдался в полушарии, в которое осуществляли инъекцию (данные биохимии, Фиг. 22В) и в полушарии, в которое не осуществляли инъекцию (окрашивание INCAT100, Фиг. 22С). Оба изотипа IgG2a и IgG1 значительно снижали индукцию таупатии при совместном введении с ПСФ-тау, полученным из головного мозга, пораженного БА ($p < 0,0001$). Результаты были подтверждены посредством ИГС контралатерального полушария.

[00280] Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от существа и объема настоящего изобретения.

[00281] Пример 10. Сравнение ПНП тау и БА тау

Прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) является редким и фатальным нейродегенеративным расстройством, характеризующимся паркинсонизмом, постуральной нестабильностью и падениями, надъядерным параличом взора и деменцией (Steele et al., 1964, Archives of Neurology 10:333-359). Патологически наблюдается преимущественное накопление 4-повторного (4R) тау в стволе головного мозга и базальных ганглиях, а также в других областях головного мозга (Dickson DW. Handbook of Clinical Neurology 2008;89:487-491; Williams & Lees, 2009, The Lancet Neurology 8:270-279). Учитывая отсутствие других патологий, таких как амилоид, ПНП считается первичной таупатией, и данные на животных моделях позволяют предположить, что ПНП тау может подвергаться образованию «семян», аналогично тому, что предположительно происходит при БА (Clavaguera et al. 2013, PNAS 110:9535-9540; Sanders et al., 2014, Neuron 82:1271-1288). Как таковой, ПНП можно лечить антителом по изобретению. Была проведена серия экспериментов для характеристики сходства ПНП тау и ПСФ тау при БА.

[00282] Способы

[00283] Ткань головного мозга человека:

Криоконсервированная ткань пациенты из двух обычно сильно пораженных областей головного мозга от пациентов с клинически диагностированным ПНП (n=5) (хвостатое ядро=CAU и скорлупа

чечевицеобразного ядра=PUT) и менее пораженной области головного мозга (верхняя лобная извилина=GFS) и те же самые области головного мозга для двух контролей (= без таупатии) были получены из Банка мозга Нидерландов. Ткань использовали как для агрегационного анализа так и для иммуногистохимического окрашивания, описанных ниже. Кριοконсервированная ткань от 9 пациентов со спорадической болезнью Альцгеймера была получена из Пенсильванского университета и использована для агрегационного анализа. Кριοконсервированная ткань от 1 пациента с БА была получена из Университета Ньюкасла и использована для иммуногистохимического окрашивания.

[00284] *Гомогенизация ткани головного мозга:* Кριοконсервированная ткань была гомогенизирована в 10 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 7,4, фильтр: 0,22 мкм+полные мини-ингибиторы протеазы, не содержащие ЭДТА (Roche, кат. № 11 836 170 001), с гомогенизатором Даунса при 1000 об/мин для 10 ударов для получения 10% мас./об гомогенатов. Гомогенаты центрифугировали при 27000 × g, 10 минут при 4°C и супернатант хранили в аликвотах при -80°C до использования.

[00285] *Агрегационные анализы:* Был проведен специфический для агрегации сэндвич-MSD-иммуноанализ, в котором анти-фосфотау-антитела AT8 и PT3 использовались в качестве антител для захвата и обнаружения. Покрывающее антитело разбавляли в PBS (1 мкг/мл), аликвотировали в планшеты MSD (30 мкл на лунку) (L15XA, Mesoscale Discoveries) и инкубировали при 4 °C. После промывания 5 × 200 мкл PBS/0,5% Tween-20 планшеты блокировали 0,1% казеином в PBS и снова промывали 5 × 200 мкл PBS/0,5% Tween-20. После добавления образцов и стандартов (оба разбавлены в 0,1% казеина в PBS) планшеты инкубировали при 4 °C. Затем планшеты промывали 5 × 200 мкл антител, детектируемых конъюгированным с PUL/0,5% Tween-20 и SULFO-TAG™, в 0,1% казеина в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при этом раскручивая при 600 об/мин. После заключительной промывки (5 × 200 мкл PBS/0,5% Tween-20) добавляли 150 мкл 2 × буфера T и планшеты считывали с помощью визуализатора MSD. Необработанные сигналы нормализовали относительно стандартной кривой, состоящей из 7 разведений одного гомогената головного мозга, пораженного БА, и выражали в виде интерполированных значений в процентах от этого стандарта.

[00286] *Иммуногистохимический анализ.* Кριοконсервированные

ткани головного мозга человека нарезами криомикротомом (толщиной 20 мкм) и хранили при -80°C перед использованием. Срезы сушили с последующей фиксацией формалином, блокированием эндогенной пероксидазы посредством 3% перекиси водорода (DAKO, Glostrup, Denmark, S2023) и пермеабиллизацией в 1x PBS+0,3% Triton X-100 в течение 1 часа. Первичные антитела (PT3 0,4 мкг/мл; AT8 0,4 мкг/мл) разводили в разбавителе антител компонентами, уменьшающими фоновое свечение (DAKO, S3022), и наносили на срезы в течение 1 часа. После интенсивной промывки предметные стекла инкубировали с HRP-конъюгированным антимышиным вторичным антителом (Envision, DAKO, K4000) с последующим хромогенным DAB-мечением (DAKO, K4368). Срезы были окрашены гематоксилином, обезвожены и закреплены на органической среде для заключение образцов (Vectamount, Vector labs, Берлингем, штат Калифорния, США, H-5000). Визуализация проводилась с помощью Hamamatsu NanoZoomer 2.0 rs (Hamamatsu Photonics, Сидзуока, Япония).

[00287] Результаты

[00288] Агрегационные анализы: Агрегационные анализы проводили для характеристики степени фосфорилирования ПНП тау. Реактивные агрегаты PT3 присутствовали в головном мозге, пораженном ПНП, хотя уровни агрегации были ниже, чем в головном мозге, пораженном БА (Фиг. 23). Результаты, полученные с эталонным антителом AT8, были аналогичны результатам, полученным с PT3. Эти результаты предполагают, что все сайты фосфорилирования, оцененные с использованием различных антител к фосфо-тау, присутствуют на ПНП-тау, хотя в ПНП меньше агрегатов тау по сравнению с БА.

[00289] Иммуногистохимический анализ. Окрашивание антителом PT3 на криосрезах головного мозга, пораженного БА или ПНП, продемонстрировало окрашивание в анатомических областях (то есть хвостом ядра и скорлупе чечевицеобразного ядра), пораженных ПНП (Фиг. 24). Нейропатологические признаки ПНП, включая тау+нейроны и пучковые астроциты, были обнаружены с помощью анти-фосфо-тау-антитела PT3. Результаты, полученные с AT8, были аналогичны результатам, полученным с PT3.

[00290] Выводы

[00291] Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что PT3 связывается с ПНП тау.

[00292] Пример 11 – Созревание аффинности PT3-HFA

[00293] SPR-связывающая характеристика аффинно-зрелых

антител к ПСФ-тау

[00294] Моноклональные антитела с созревшей аффинностью тестировали на связывание с ПСФ-тау, выделенным из головного мозга при болезни Альцгеймера. Исследования кинетики связывания и аффинности проводили с использованием системы ProteOn XPR36 (Bio Rad, Геркулес, штат Калифорния) при 25 °C с PBS pH 7,4, с добавлением 3 mM ЭДТА и 0,005% Tween 20 в качестве рабочего или системного буфера.

[00295] Чип датчика GLC был ковалентно иммобилизован мышинным анти-тау-антителом, HT7 (ThermoFisher, кат. № MN1000), используя рекомендованный производителем протокол для химии аминного связывания (~ 5000 единиц ответа, RU). Буфер для связывания представлял собой 10 mM, pH 4,5 ацетат натрия. PHF-тау получали 2-кратным центрифугированием при 5000 × g при 5°C в течение 10 минут. Супернатант из второго центрифугирования разбавляли в проточном буфере (1/125) и связывали с иммобилизованной поверхностью HT7 (~ 300 RU). После захвата-связывания поверхность активировали и деактивировали для создания гомогенной поверхности ПСФ-тау для исследований связывания антител. Анти-тау-антитела и их Fab (полученные в рабочем буфере, 0,024–75 нМ при 5-кратных разведениях) инъецировали со скоростью 50 мкл/мин на поверхность ПСФ-тау для измерения связывания. Профили ассоциации и диссоциации контролировали в течение 4 минут и 2 часов, соответственно. После диссоциации сенсорный чип регенерировали с использованием многократных инъекций 10 mM глицина, pH 2,0 и рабочего буфера. Эталонную поверхность (без ПСФ-тау) использовали для мониторинга неспецифического связывания введенных mAb или Fab. Антитело к HT7 использовали в качестве положительного контроля. Сенсограммы связывания для mAb были подобраны с использованием модели двухвалентного связывания, где явная аффинность или связывание, обусловленное авидностью (K_D), сообщалось как отношение скорости диссоциации и скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}). Модель связывания Ленгмюра 1:1 использовали для анализа кинетики Fab.

[00296] Исходное человеческое антитело (B296) показало сильное связывание с ПСФ-тау ($K_D=6,2$ пМ) и было обусловлено очень медленной скоростью диссоциации, где в течение 2 часов наблюдали не более 5% диссоциации mAb (таблица 19, Фиг. 25). Зрелые по аффинности антитела показали улучшение связывания с ПСФ-тау с аффинностями в пределах от 1,8 до 2,5 пМ. B711 и B809

продемонстрировали 3-кратное улучшение по сравнению с исходным антителом, однако отклонения были практически неразличимы между всеми антителами (Фиг. 25). Fab в целом показали на порядок более слабое связывание с ПСФ-тау по сравнению с их соответствующими mAb, что указывает на авид-управляемое связывание mAb с ПСФ-тау. B324 (Fab родительского mAb, B296), связанный с ПСФ-тау с внутренней аффинностью 63,2 пМ. Fab аффинно-зрелых mAb показали сходное улучшение аффинности со значениями в диапазоне от 15,6 до 31 пМ. Кроме того, два Fab, B330 (Fab из B711) и B332 (Fab из 809), продемонстрировали аналогичное улучшение в 3-4 раза по сравнению с соответствующими им mAb.

Таблица 19: Кинетика и аффинности связывания с ПСФ-тау, измеренные на приборе ProteOn SPR для mAb с созревшей аффинностью и их Fab

Образцы	Описание	k_{on} ($\times 10^6$ 1/Мс)	k_{off} ($\times 10^{-5}$ 1/с)	K_D (пМ)
B296 (mAb)	Гуманизированное родительское mAb	$1,89 \pm 0,09$	$1,17 \pm 0,09$	$6,2 \pm 0,5$
B711 (mAb)	B296 с созревшей аффинностью	$6,17$ (5,72–6,61)	$1,13$ (1,08–1,17)	$1,8$ (1,6–2,1)
B809 (mAb)	B296 с созревшей аффинностью	$6,45 \pm 1,18$	$1,27 \pm 0,15$	$2,0 \pm 0,5$
B333 (mAb)	B296 с созревшей аффинностью	$2,68 \pm 0,23$	$0,68 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,4$
B324 (Fab)	Fab B296	$1,43 \pm 0,06$	$9,03 \pm 0,08$	$63,2 \pm 2,8$
B330 (Fab)	Fab B711	$4,60$ (4,53–4,66)	$7,15$ (6,94–7,36)	$15,6$ (15,3–15,8)
B332 (Fab)	Fab B809	$4,64 \pm 0,29$	$12,0 \pm 0,12$	$25,8 \pm 1,7$
B331 (Fab)	Fab B333	$1,72 \pm 0,07$	$5,31 \pm 0,10$	$31,0 \pm 1,5$

N=2–3 повторностей в рамках одного эксперимента. Значения представлены как среднее $\pm$ SD (или диапазон)

[00297] Связывание с фосфопептидом посредством ИФА

Связывание с тау-фосфопептидом анализировали с помощью ИФА, где пептид (10 нг/мл) непосредственно наносили на планшет в течение ночи. После промывания планшета и блокирования 0,1% казеином в PBS планшеты инкубировали с различными концентрациями mAb HFA-PT3 (B296) и аффинно-зрелых вариантов HFA-PT3 (B809, B333 и B711) (Фиг. 26А). После инкубации с антителами планшеты промывали и 50 мкл на лунку меченного HRPO анти-Fab-антитела (Jackson ImmunoResearch laboratories) (разведенное 1: 10000 в блокирующем буфере). После определения осуществляли еще один этап промывки с помощью TMB (Thermo Scientific) «One step» в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты анализировали в EnVision® 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Волтам, штат Массачусетс, США). Кривые связывания были получены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism7.0. Из кривых связывания на Фиг. 26А можно видеть, что B296 проявлял самую низкую аффинность, тогда как B711 демонстрировал наиболее сильное связывание по сравнению с B296, но также с B333 и B809. Это свидетельствует о том, что B711 является гуманизированным антителом PT3 с наибольшей аффинностью к пептиду pT217. Аналогичный эксперимент с Fab (Фиг. 26В) продемонстрировал, что M333 (Fab из B711) имел сходное связывание пептида по сравнению с B187, Fab родительской молекулы PT3. Опять же, M324 (Fab B296, HFA-PT3) демонстрировал более слабое связывание по сравнению с вариантами исходного Fab и аффинно-зрелого PT3-HFA.

Таблица 20: Краткое изложение связывания pT217 с помощью ИФА

	EC ₅₀ (пМ)	
Fab	Средн. значение	SD
B187	109,82	73,70037
M324	340,8333	121,6609
M330	106,5133	62,22259
mAb	Средн. значение	SD
B296	433,425	139,2647
B809	91,6675	59,01867
B333	164,345	92,99161
B711	70,745	48,86815

N=2 повторностей в рамках по меньшей мере 2 экспериментов.

Значения представлены как среднее $\pm$ SD.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abhinandan and Martin, *Mol Immunol*. 45:3832-9, 2008
- Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 2):213-21, 2010
- Allen et al., *J Neurosci*. 22(21):9340-51, 2002
- Almagro, *Mol Recognit*. 17:132-43, 2004
- Asuni et al., *J Neurosci*. 27:9115-29, 2007
- Boutajangout et al., *J Neurochem*. 118:658-67, 2011
- Boutajangout et al., *J Neurosci*. 30:16559-66, 2010
- Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov*. 8:783-93, 2009
- Butner and Kirschner, *J Cell Biol*. 115(3):717-30, 1991
- Chai et al., *J Biol Chem*. 286:34457-67, 2011
- Chothia and Lesk, *J Mol Biol*. 196:901-17, 1987
- Clavaguera et al., *Nat Cell Biol*. 11:909-13, 2009
- Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(23):9535-40, 2013
- Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(23):9535-40, 2013
- Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 50(Pt 5):760-3, 1994
- Collin et al., *Brain*. 137(Pt 10):2834-46, 2014
- de Calignon et al., *Neuron*. 73(4):685-97, 2012
- Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004
- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996
- Fransson et al., *J Mol Biol*. 398(2):214-31, 2010
- Frost et al., *J Biol Chem*. 284:12845-52, 2009
- Funk et al., *J Biol Chem*. 290(35):21652-62, 2015
- Goedert et al., *Biochemical J*. 301(Pt3):871-877
- Hanger et al., *Trends Mol Med*. 15:112-9, 2009
- Hoffmann et al., *Biochemistry*. 36(26):8114-24, 1997
- Holmes et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(41):E4376-85, 2014
- Iba et al., *Acta Neuropathol*. 130(3):349-62, 2015
- Iba et al., *J Neurosci*. 33(3):1024-37, 2013
- Julien et al., *Methods Mol Biol*. 849:473-91, 2012
- Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 2):125-32, 2010

- Knappik et al., *J Mol Biol.* 296:57-86, 2000
- Knight et al., *Platelets.* 15:409-18, 2004
- Kohler and Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975
- Krebs et al., *J Immunol Methods.* 254:67-84, 2001
- Lee et al., *Cell Rep.* 16(6):1690-700, 2016
- Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003
- Leong et al., *Cytokine.* 16:106-19, 2001
- Li and Lee, *Biochemistry.* 45(51):15692-701, 2006
- Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4):610-20, 2012
- Lonberg et al., *Nature.* 368:856-9, 1994
- Malia et al., *Proteins.* 84:427-434, 2016
- Martin and Thornton, *J Mol Biol.* 263(5):800-15, 1996
- Matsuo et al., *Neuron.* 13(4):989-1002, 1994
- McCoy et al., *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674, 2007
- McEwan et al., 2017, *PNAS* 114(3):574-9
- Mendez et al., *Nat Genet.* 15:146-56, 1997
- Mercken et al., *Acta Neuropathol.* 84(3):265-72, 1992
- Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991
- Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737-48, 2008
- Morris et al., *Nat Neurosci.* 18(8):1183-9, 2015
- Morris et al., *Neuron.* 70:410-26, 2011
- Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997
- Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053-63, 2007
- Otvos et al., *J Neurosci Res.* 39(6):669-73, 1994
- Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991
- Peeraer et al., *Neurobiol Dis.* 73:83-95, 2015
- Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:10029-33, 1989
- Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250-7, 2010
- Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016
- Seubert et al., *J Biol Chem.* 270(32):18917-22, 1995
- Shi et al., *J Mol Biol.* 397:385-96, 2010
- Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009
- Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963-73, 2005
- Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4884-8, 1988
- Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970
- Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003
- Yoshiyama et al., *Neuron.* 53(3):337-51, 2007
- Zhao et al., *Protein Expr Purif.* 67(2):182-9, 2009

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с фосфорилированным тау-белком на фосфорилированном эпитопе, содержащим

(а) фосфорилированный T212 и фосфорилированный T217 тау-белка, и фосфорилированный эпитоп, имеющий или находящийся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO:48;

(b) фосфорилированный T217 тау-белка и фосфорилированный эпитоп, имеющий или находящийся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52; или

(с) фосфорилированный T212 тау-белка и фосфорилированный эпитоп, имеющий или находящийся в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO:54.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором моноклональное антитело содержит HCDR1 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 71, 80; HCDR2 любой из SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 72, 81; HCDR3 любой из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 73; LCDR1 любой из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22, 70; LCDR2 любой из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 23; LCDR3 любой из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 24.

3. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, содержащее

(а) определяющие комплементарность тяжелой цепи иммуноглобулина области (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и определяющие комплементарность легкой цепи иммуноглобулина области (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно;

(с) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно;

(d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно;

(е) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 80, 81 и 9, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72, 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 70, 20 и 21, соответственно;

(g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 71, 72 и 73, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно;

(h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 области V_H , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 области V_L , имеющей полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

причем антители или его антигенсвязывающий фрагмент связывают ПФС-тау.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28 и 29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 31, 32, 33 и 34.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28 и 29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность любой из

SEQ ID NO: 31, 32, 33 и 34.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную V_H тяжелой цепи, имеющей полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 45, 74, 76 и 78, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную V_L легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 31, 75, 77 и 79.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность V_H тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 45, 74, 76 и 78, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность V_L легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 31, 75, 77 и 79.

8. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, содержащее

(a) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(b) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(c) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 26 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 34;

(d) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(e) V_H , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 27 и V_L , имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31;

(f) V_H тяжелой цепи SEQ ID NO: 74 и V_L легкой цепи SEQ ID NO: 75;

(g) V_H тяжелой цепи SEQ ID NO: 76 и V_L легкой цепи SEQ ID NO: 77; или

(h) V_H тяжелой цепи SEQ ID NO: 78 и V_L легкой цепи SEQ ID NO: 79.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, содержащее тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 45, 74, 76 и 78, и легкую цепь,

имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 46, 75, 77 и 79.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, содержащее тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 45, 74, 76 и 78, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 46, 75, 77 и 79.

11. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, содержащее

(a) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 45 и легкую цепь с SEQ ID NO: 46;

(b) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 74 и легкую цепь с SEQ ID NO: 75;

(c) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 76 и легкую цепь с SEQ ID NO: 77; или

(d) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 78 и легкую цепь с SEQ ID NO: 79.

12. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11, содержащее константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой цепи каппа человека.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12.

14. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 13.

15. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 14.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ уменьшения патологической агрегации тау или распространения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 16.

18. Способ лечения таупатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 16.

19. Способ по п. 18, в котором таупатию выбирают из группы, состоящей из семейной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной

с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, деменции Пика, прогрессивного субкортикального глиоза, деменции с образованием только клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернистыми шарами, комплекса боковой амиотрофический склероз-деменция-паркинсонизм, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезни Галлервордена-Шпатца, миозита с включенными тельцами, болезни Крейцфельда-Якоба, множественной системной атрофии, липоидного гистиоцитоза типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с отложением прионного белка, подострого склерозирующего панэнцефалита, дистрофической миотонии, бокового амиотрофического склероза с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (кулачная болезнь).

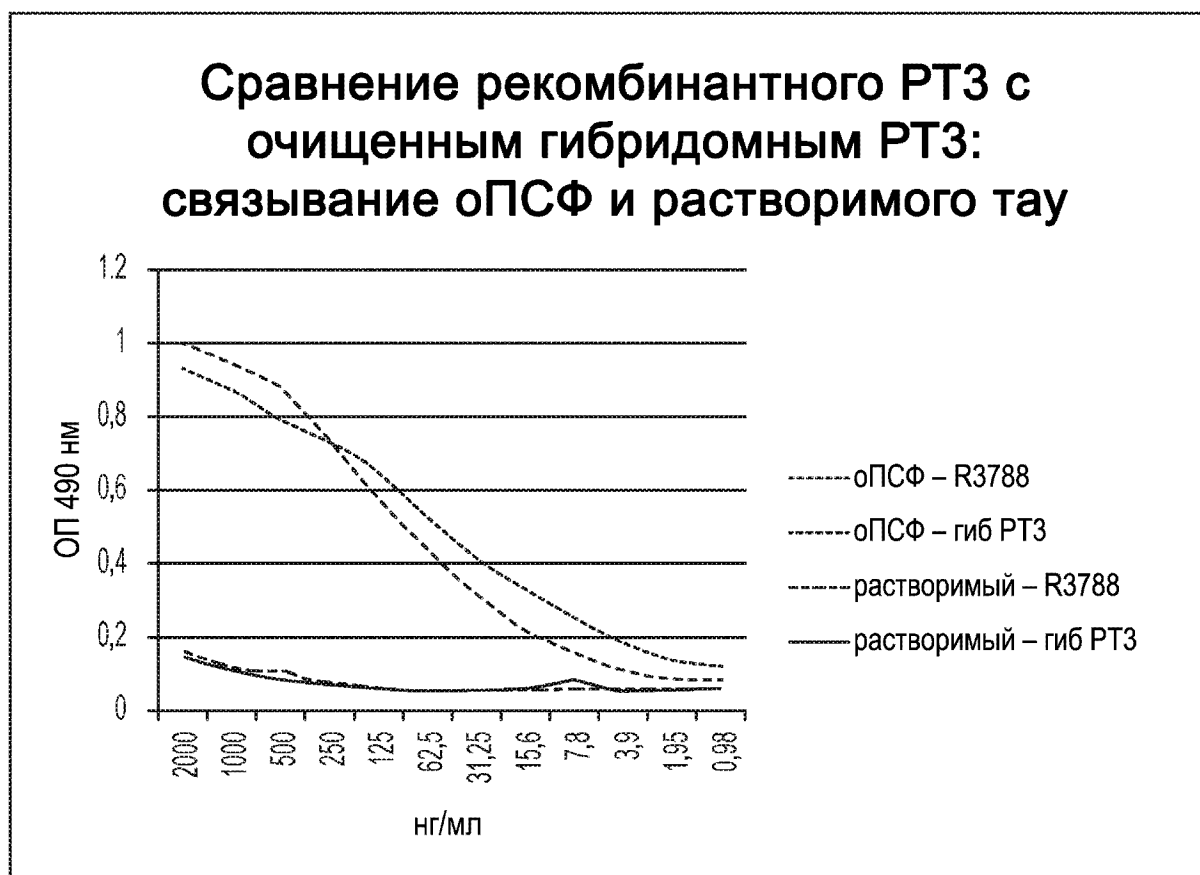
20. Способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток.

21. Способ обнаружения присутствия ПСФ-тау в биологическом образце от субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-12 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента ПСФ-тау в образце от субъекта.

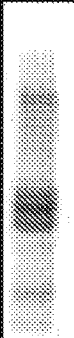
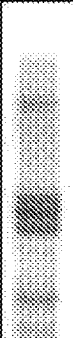
22. Способ по п. 21, в котором биологический образец представляет собой образец крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

По доверенности

ФИГ. 1

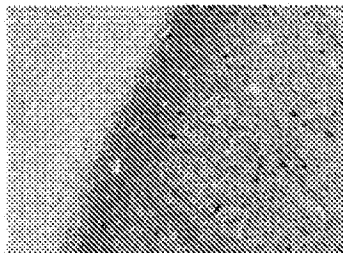


ФИГ. 2

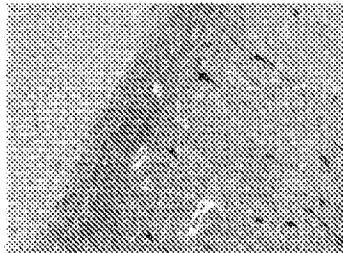
AT8		AT100		HT7		BT2		PT3	
NT	PT	NT	PT	NT	PT	NT	PT	NT	PT
									

ФИГ. 3

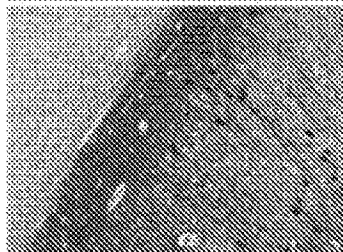
ФИГ. 3А



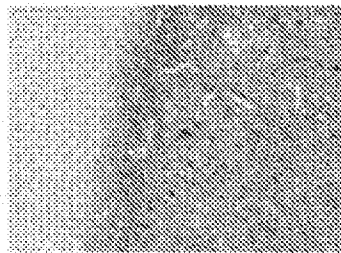
ФИГ. 3В



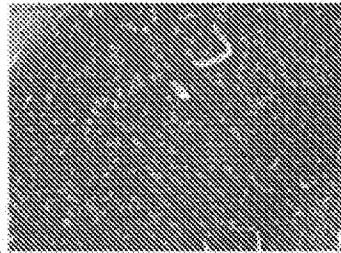
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

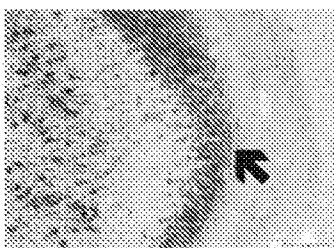


ФИГ. 3Е

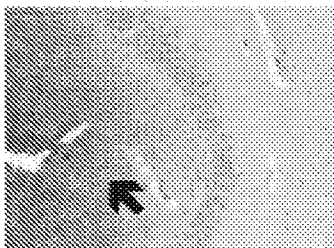


ФИГ. 4

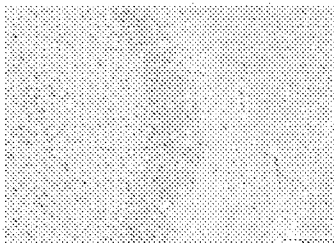
ФИГ. 4А



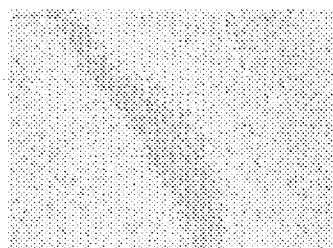
ФИГ. 4В



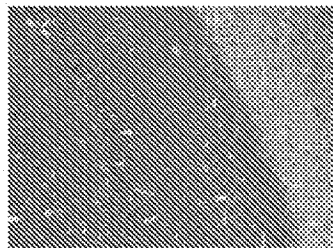
ФИГ. 4С



ФИГ. 4D

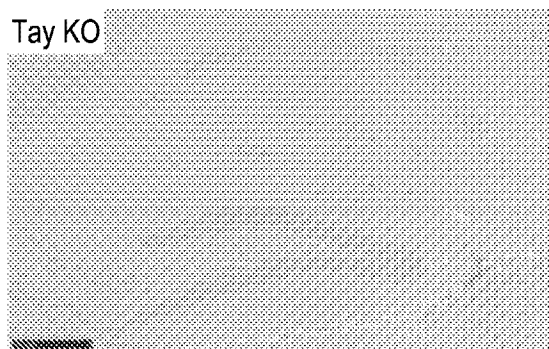


ФИГ. 4Е

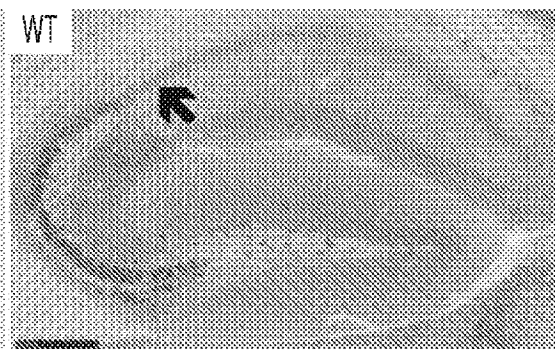


ФИГ. 5

ФИГ. 5А

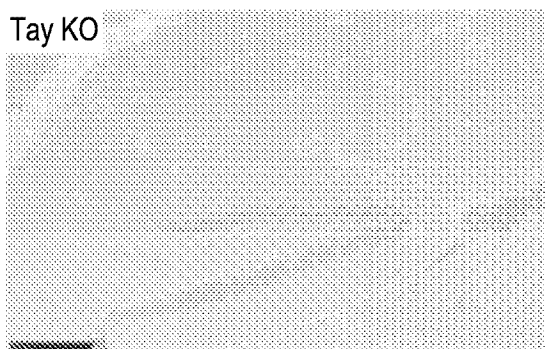


ФИГ. 5В

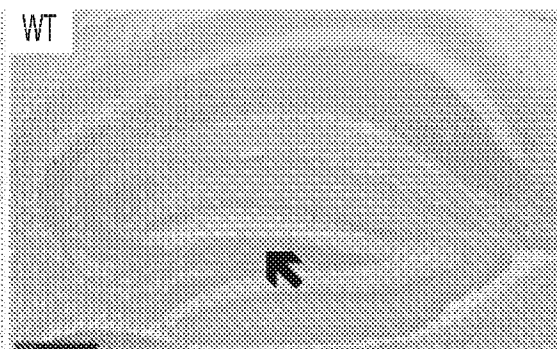


ФИГ. 6

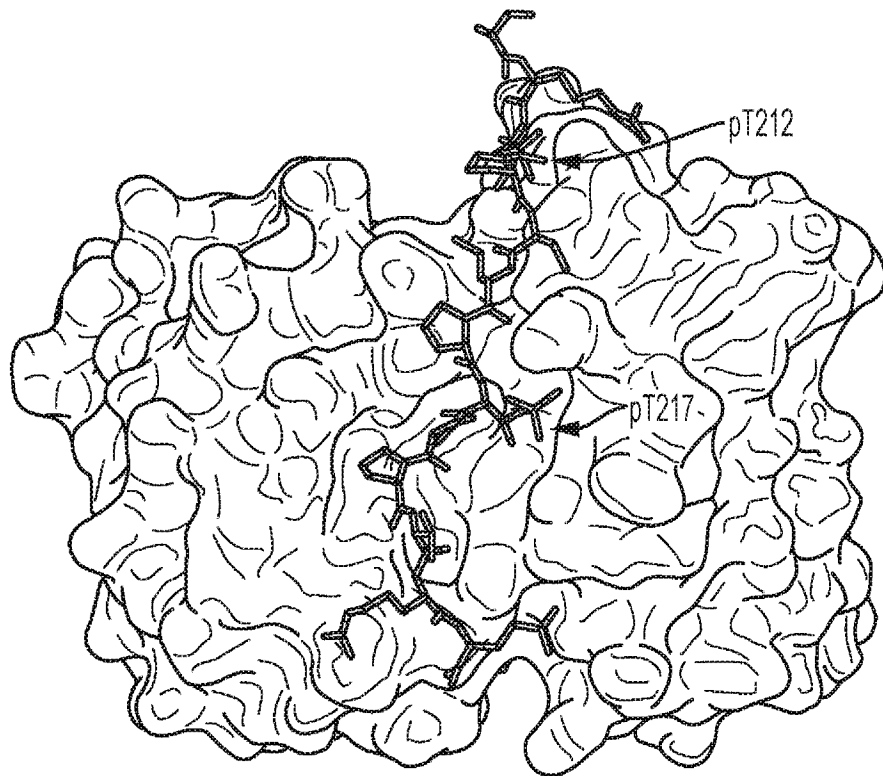
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



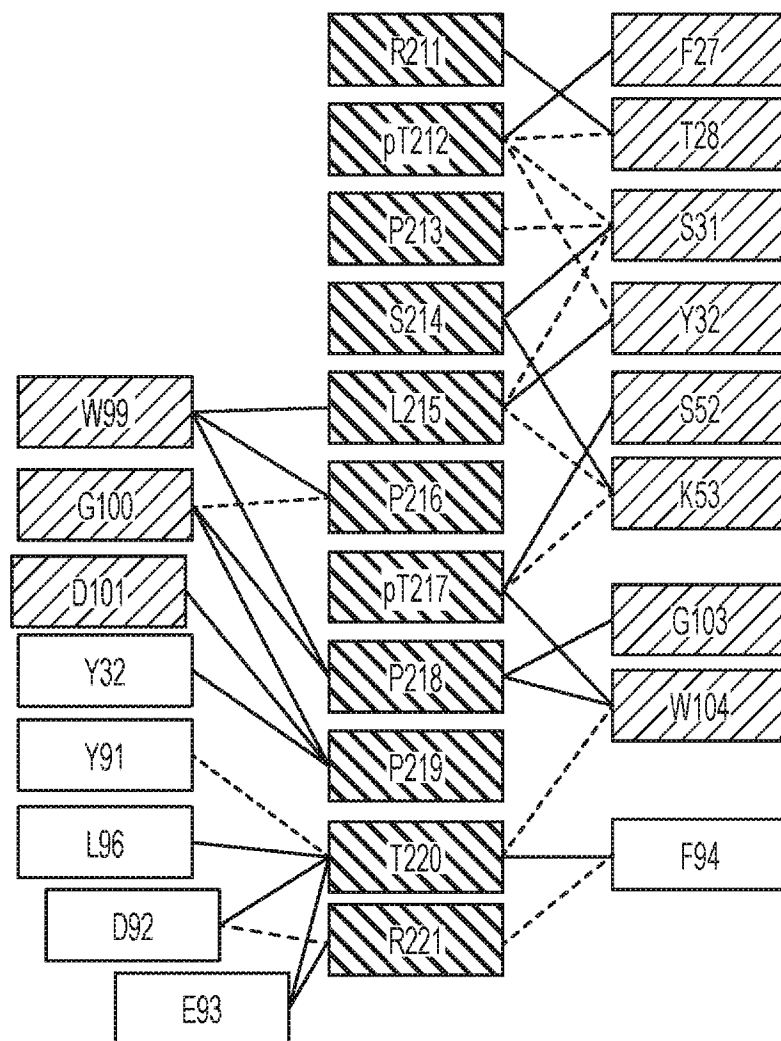
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

VH

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
.		.		.		.		.		.		.

VH10 EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPKEKRLWVASISKGGNTIYPNSVKGRFTISRDNARNILYLQMSLSRSEDTALYYCARGWDYGFAYWGQVTLTVSA
VH91 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISKGGNTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGWDYGFAYWGQVTLTVSS
VH92 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISKGGNTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWDYGFAYWGQVTLTVSS
VH93 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVSSISKGGNTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWDYGFAYWGQVTLTVSS
VH94 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSSYAMSWVRQAPGQRLWVMSISKGGNTIYYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWDYGFAYWGQVTLTVSS

VL

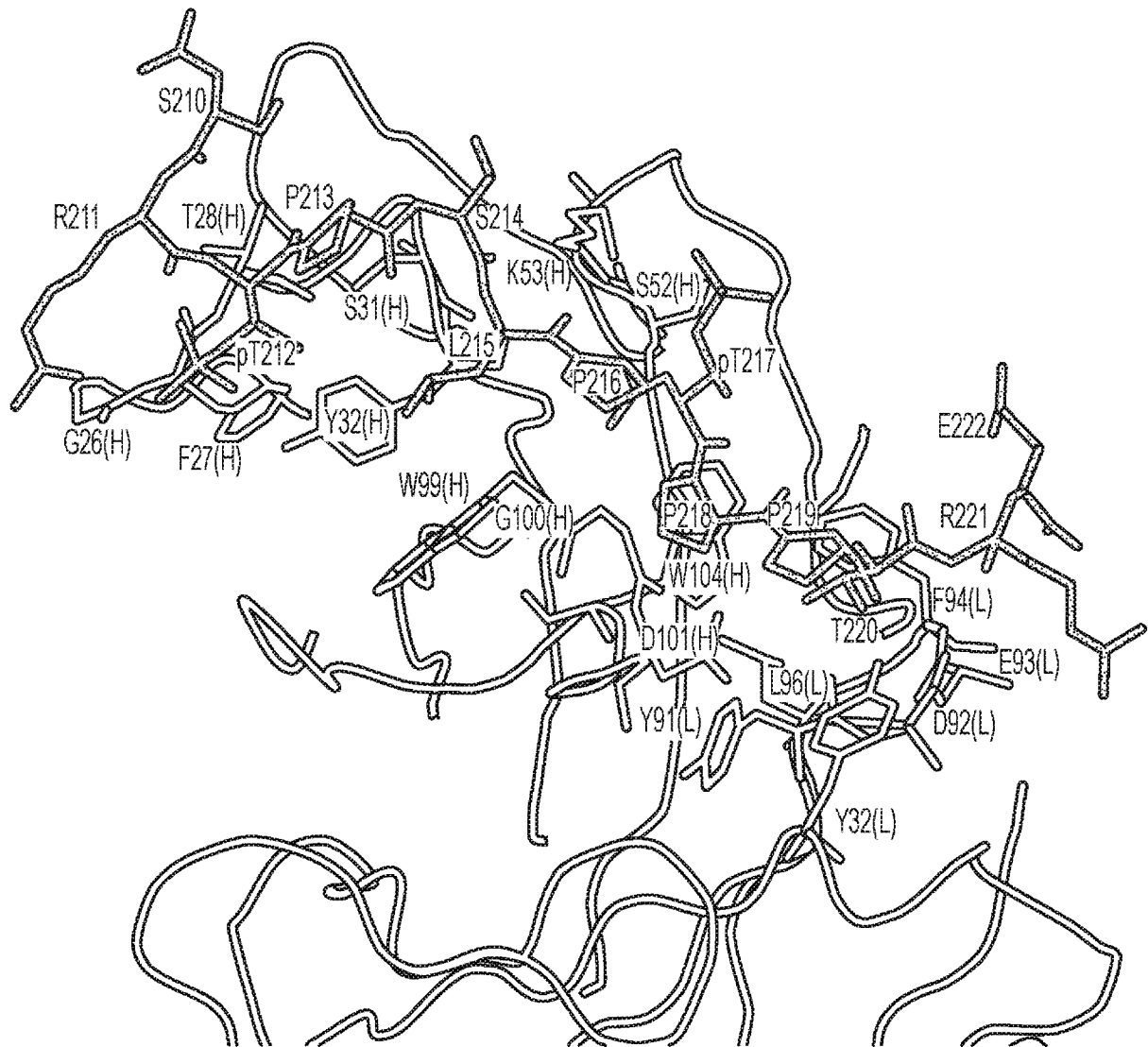
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
.		.		.		.		.		.	

VL7 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLDYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGDGKLELK
VL77 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL78 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKSLIYRANRLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL79 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK
VL80 DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCKASQDINRYLNWLQQRPQGQPRLLIYRANRLLDGVPSRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK

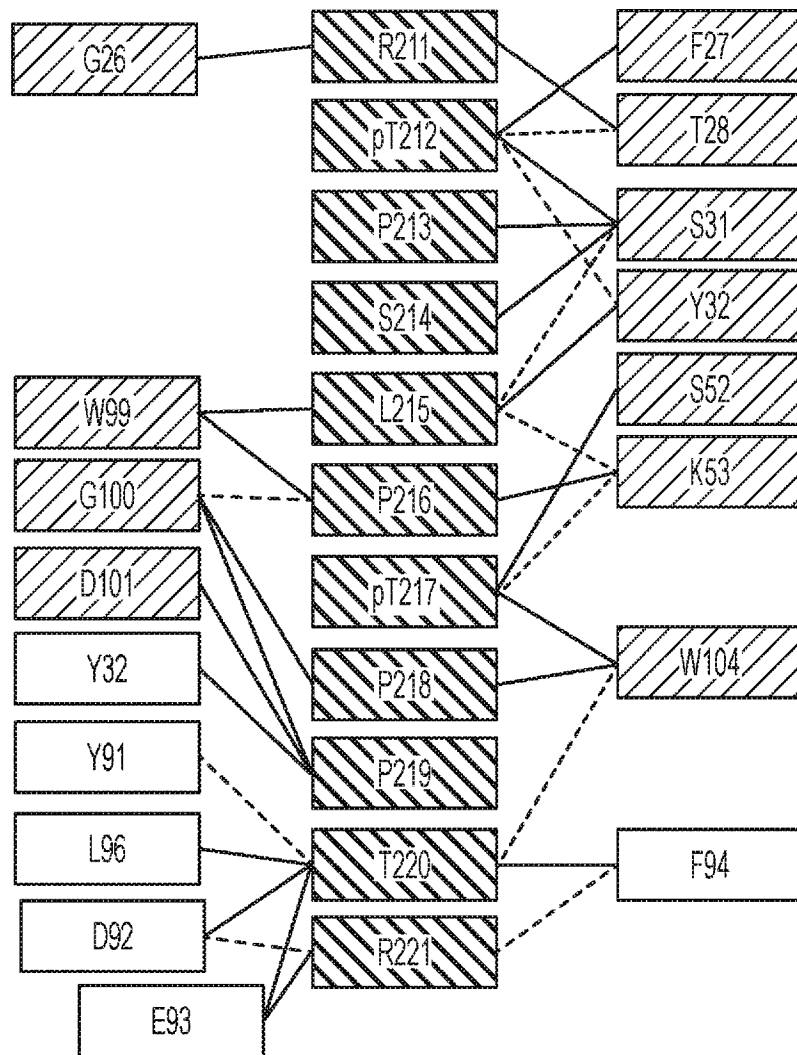
ФИГ. 11



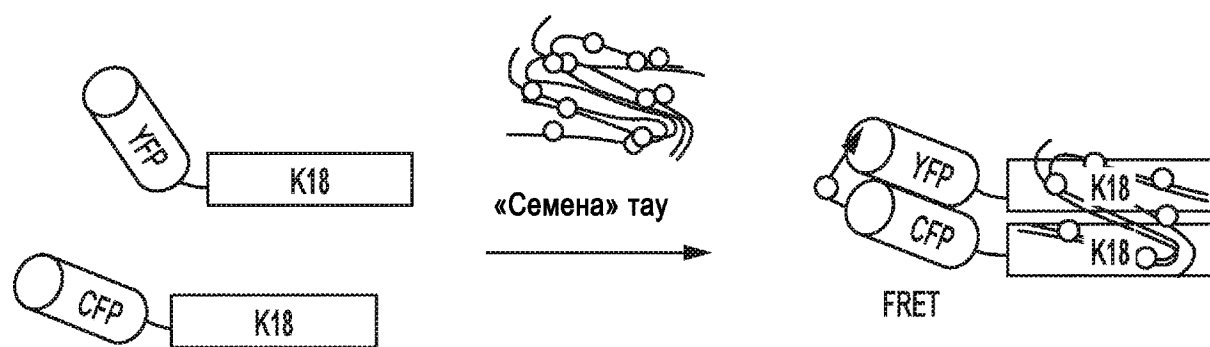
ФИГ. 12



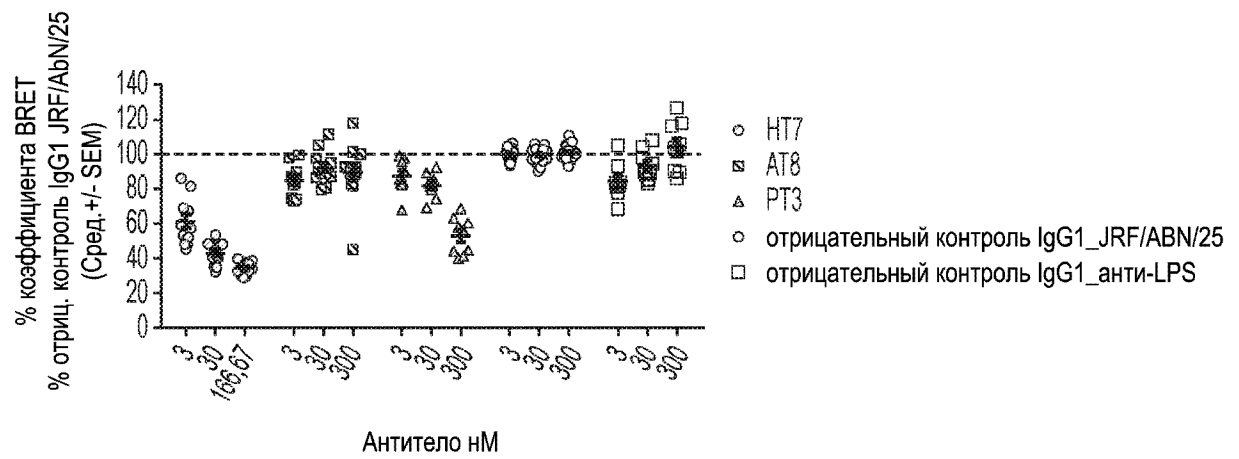
ФИГ. 13



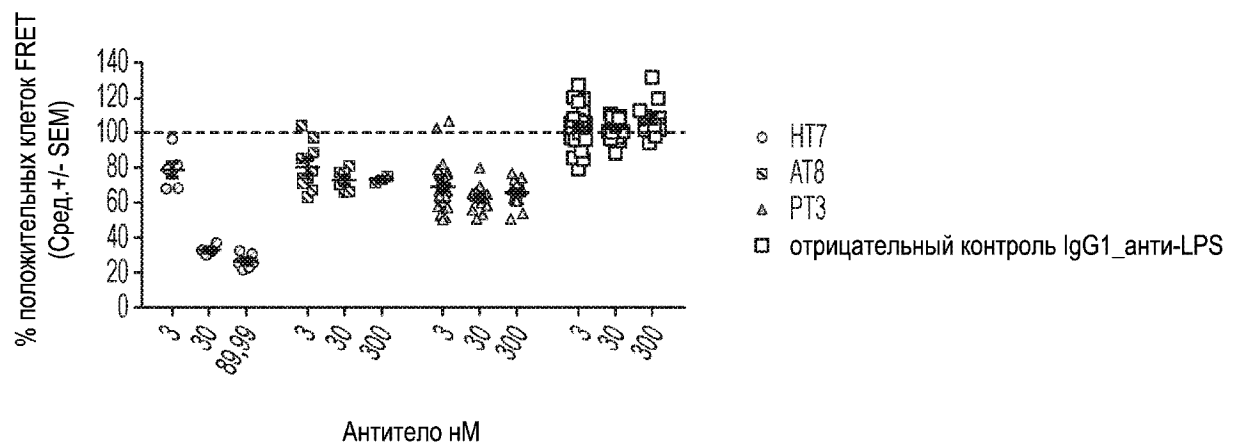
ФИГ. 14



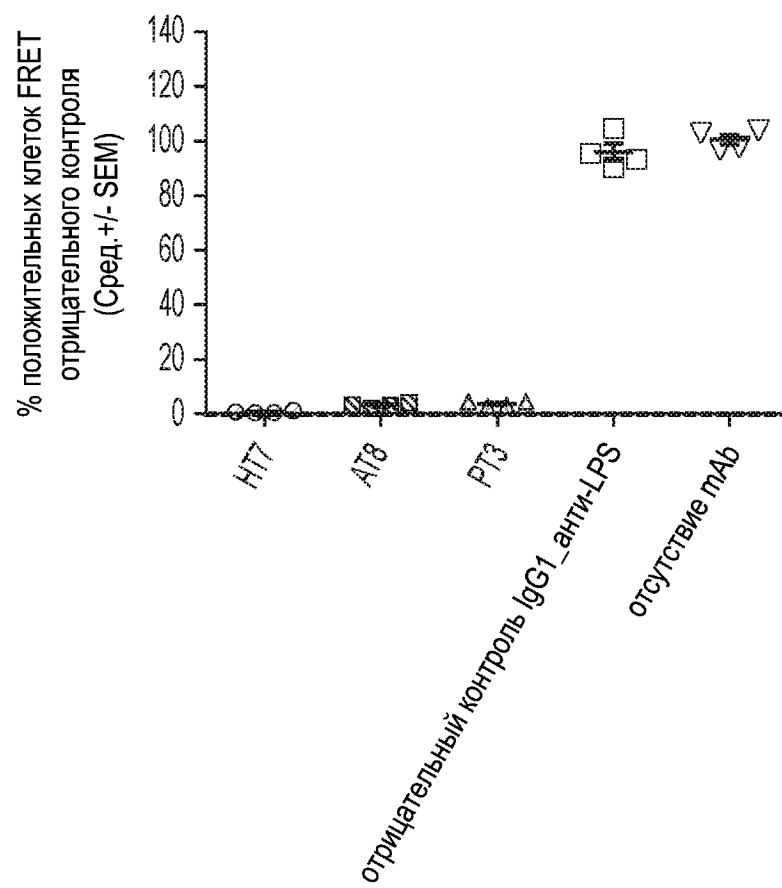
ФИГ. 15



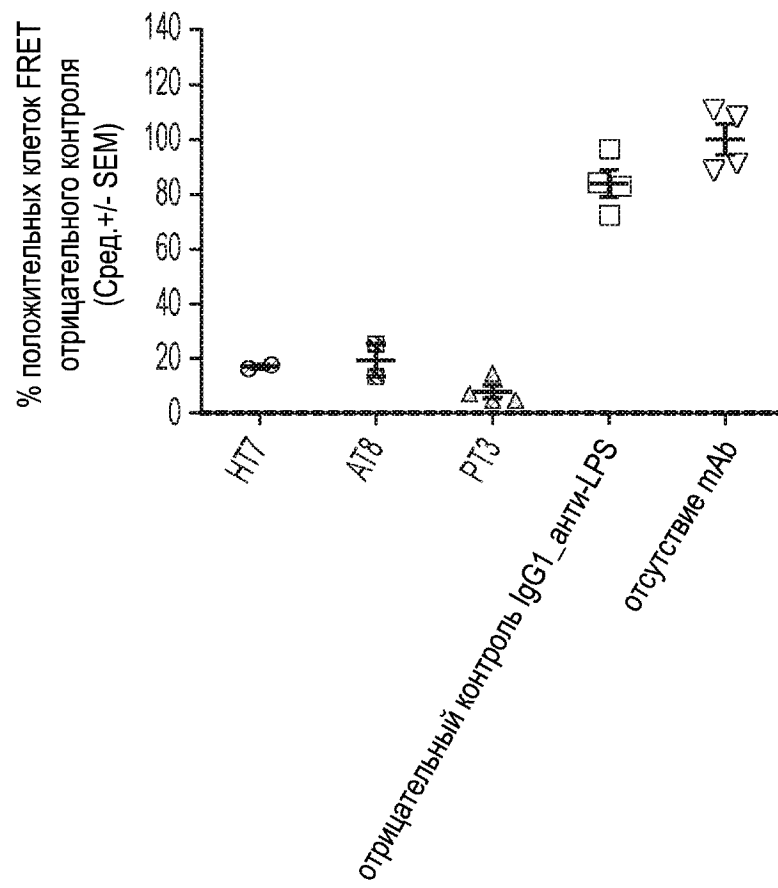
ФИГ. 16



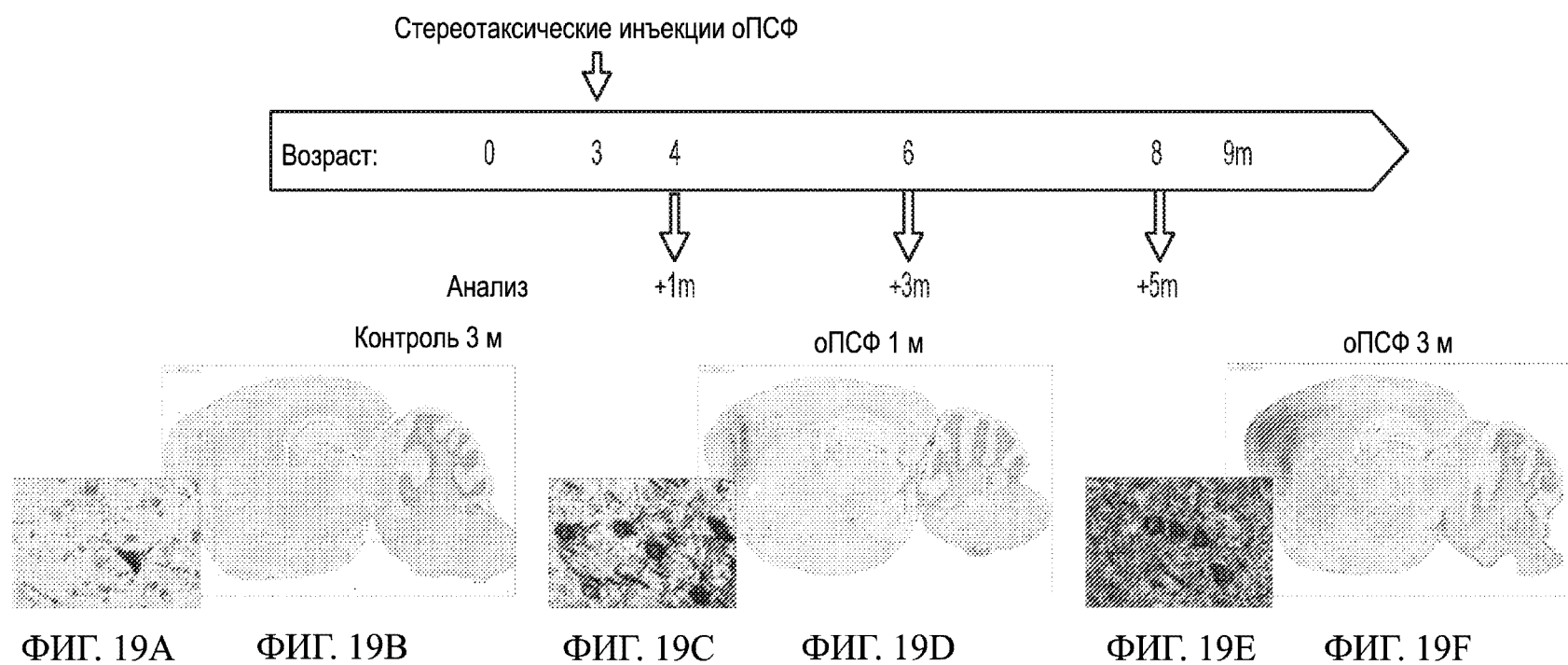
ФИГ. 17



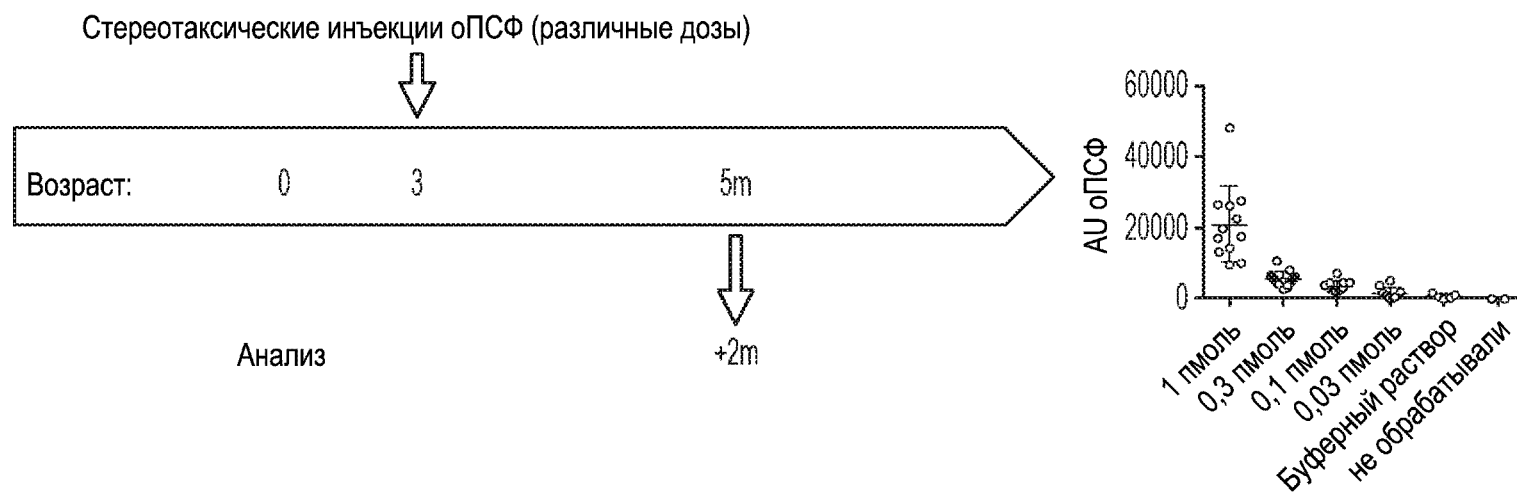
ФИГ. 18



ФИГ. 19

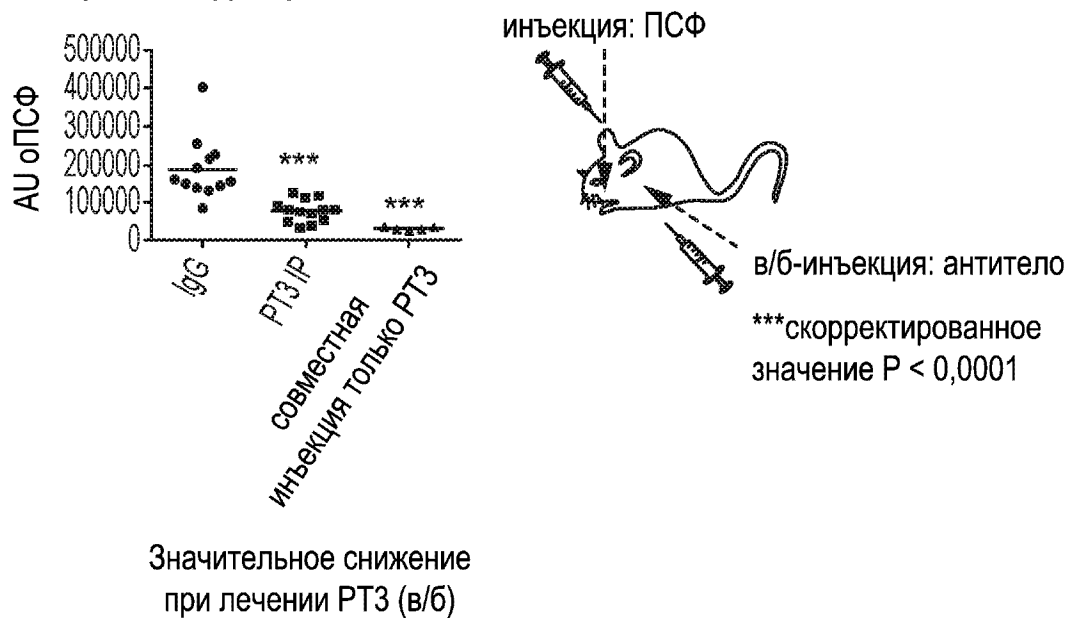


ФИГ. 19G



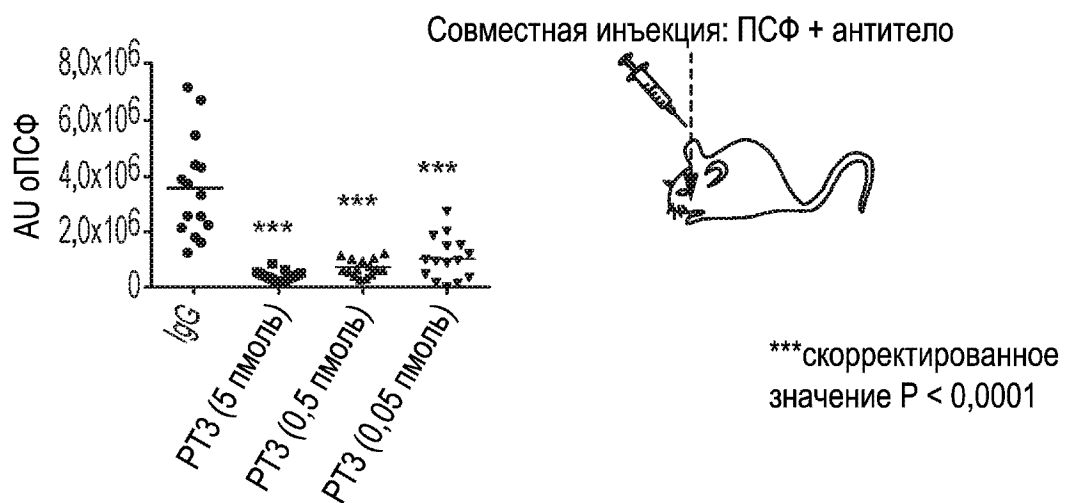
ФИГ. 20

иммуноанализ тау-агрегатов РТ51/РТ51 на нерастворимую
в саркозиле фракцию



ФИГ. 21

иммуноанализ тау-агрегатов РТ51/РТ51 на
нерастворимую в саркозиле фракцию

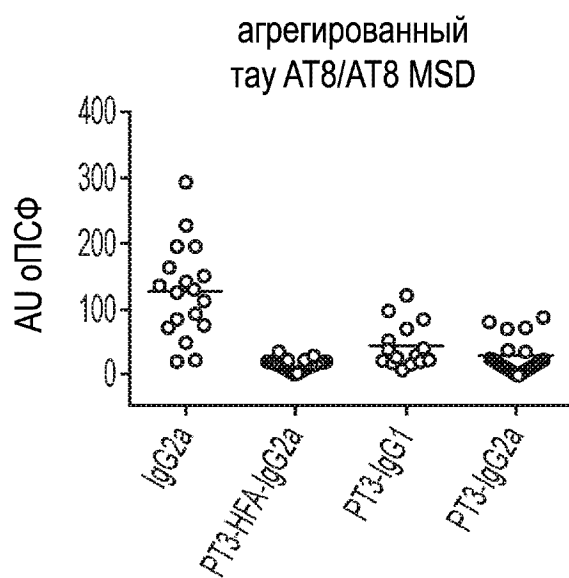


ФИГ. 22

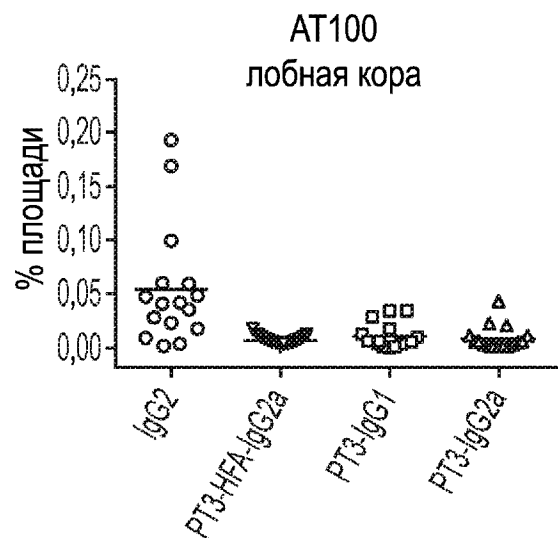
ФИГ. 22А

Группа	Совместная инъекция	в/б (20 мг/кг, 2х/неделя)	n
1	IgG1	IgG1	19
2	PT3(G1)	PT3(G1)	16
3	PT3(G2a)	PT3(G2a)	18
4	PT3(G2a-HFA)	PT3(G2a-HFA)	15

Введение	Количество	Суммарный объем (мкл)	Концентрация (мкМ)
2,5 мкл оПСФ	1 пмоль тау	5	0,2
2,5 мл антитела	25 пмоль антитела	5	5



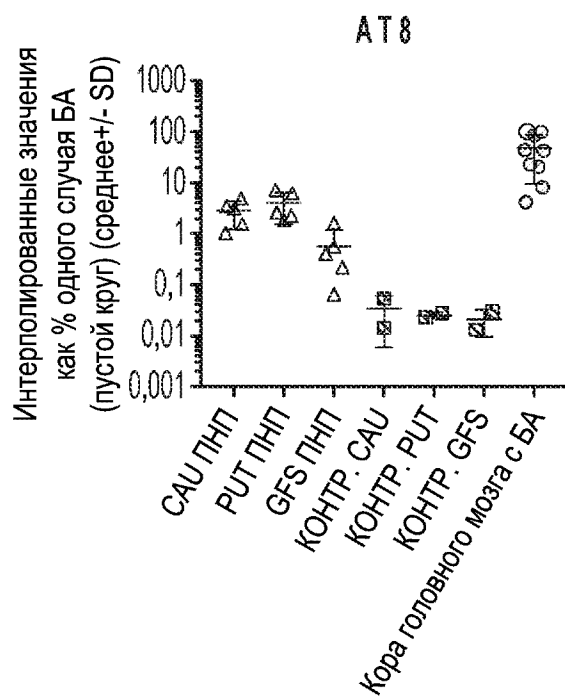
ФИГ. 22В



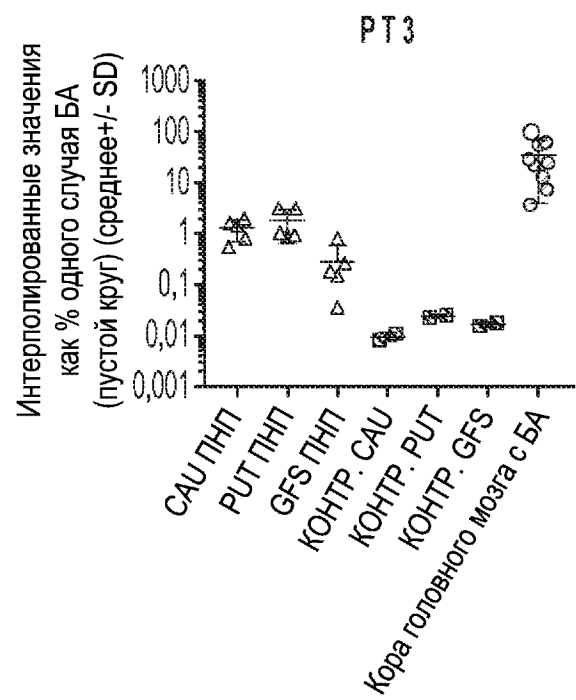
ФИГ. 22С

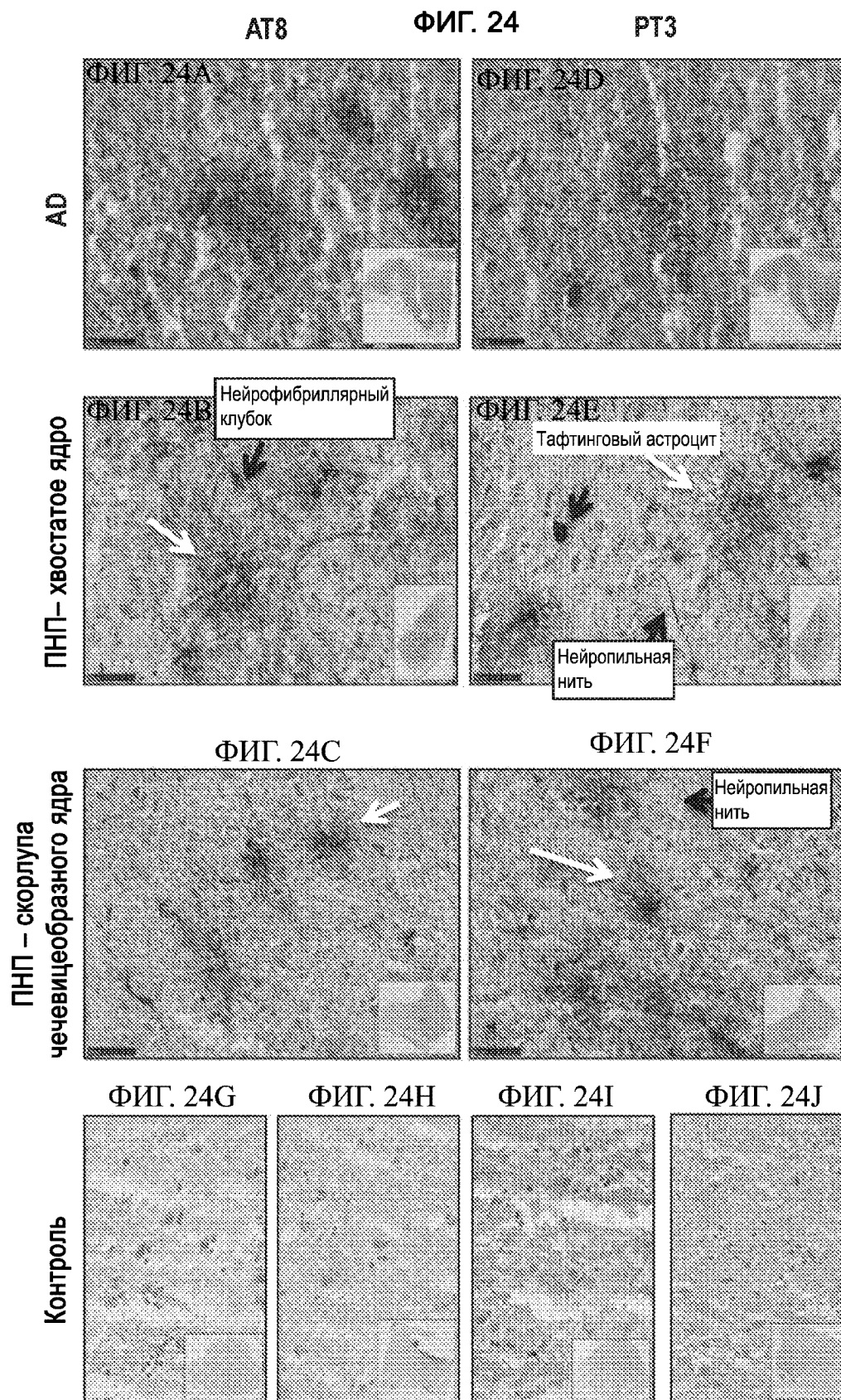
ФИГ. 23

ФИГ. 23А

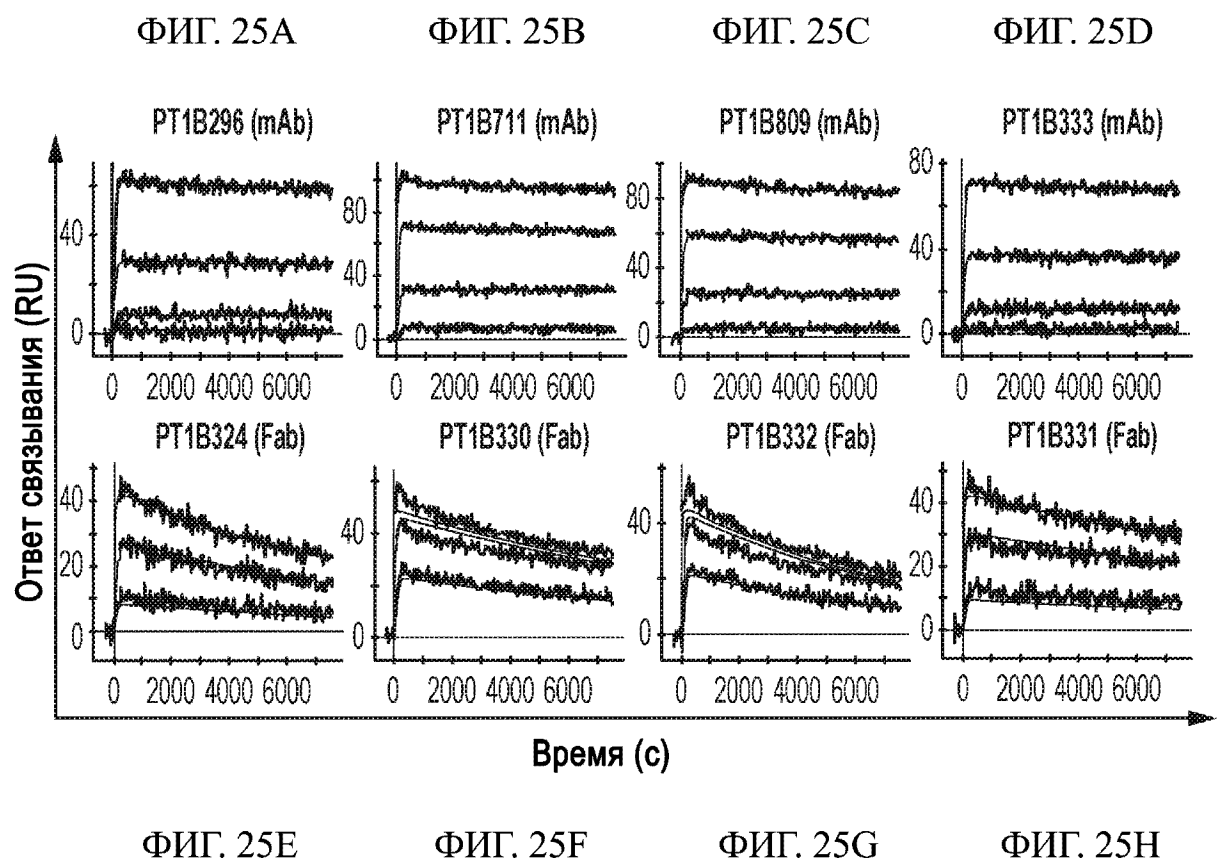


ФИГ. 23В



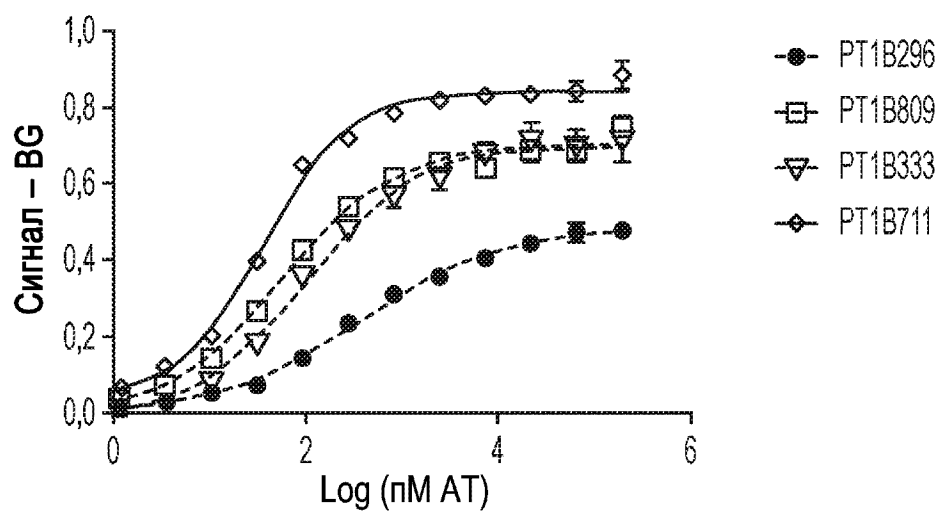


ФИГ. 25



ФИГ. 26

ФИГ. 26А



ФИГ. 26В

