

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992281** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.13

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

(22) Дата подачи заявки
2018.03.27

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ТАУ-БЕЛКОМ

(31) 17163425.6

(32) 2017.03.28

(33) EP

(86) PCT/EP2018/057770

(87) WO 2018/178077 2018.10.04

(71) Заявитель:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Юрашек Ярослав, Апетри
Константин Адриан (NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с тау-белком, ассоциированным с микротрубочками. Данное изобретение также относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам, в которых применяются связывающие молекулы или антигенсвязывающие фрагменты.

201992281

A1

A1

201992281

СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ТАУ-БЕЛКОМ**Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к медицине. Изобретение, в частности, относится к связывающим молекулам, например, антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с тау-белком и способны подавлять скопление тау-белка. Настоящее изобретение также относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам, в которых применяются связывающие тау-белок молекулы.

Предпосылки к созданию изобретения

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

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

когнитивными нарушениями. (Braak, H. and Braak, E, *Neurobiol Aging*. 1997 Jul-Aug;18(4):351-7.

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

Патологический тау-белок связан со многими таупатиями и может быть их причиной. В нормальной форме тау-белок является хорошо растворимым белком, ассоциированным с микротрубочками (Jeganathan et al., *Biochemistry* 2008; 47:10526-10539.), который связывается с микротрубочками и способствует их сборке (Drechsel et al., *Mol Biol Cell* 1992; 3:1141-1154.). Однако при таупатиях тау-белок становится гиперфосфорилированным, что приводит к его отсоединению от микротрубочек и, в конечном итоге, к слипанию молекул тау-белка между собой и скоплению в виде нейрофибриллярных клубков, которые видны в пределах дистрофического нейрита и клеточных телец (Mandelkow and Mandelkow, *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2, 2012: a006247). Количество патологического тау-белка коррелирует с прогрессирующей нейрональной дисфункцией, потерей синапсов и функциональными нарушениями у человека и в моделях на трансгенных мышах (Arriagada et al., *Neurology*. 1992 Mar;42(3 Pt 1):631-9, Baner et al., *Neurosci Lett* 1993; 162:179-182., Polydoro et al., *J. Neuroscience* 2009; 29:10741-10749., и Small and Duff, *Neuron*. 2008 Nov 26;60(4):534-42). При том, что при болезни Альцгеймера мутации тау-белка не наблюдаются, мутации в гене тау-белка, по всей видимости, приводят к некоторым формам лобно-височной деменции (Cairns et al., *Am J Pathol*, 2007; 171:

227-40), при которых проявляются тау-положительные включения, и это означает, что дисфункции тау-белка достаточно для того, чтобы вызвать нейродегенерацию. Более того, патологический тау-белок, по-видимому, является неотъемлемой частью $A\beta$ -индуцированной нейротоксичности в культуре клеток и моделях на трансгенных животных (Rapoport, M, PNAS, 2002; 99:9, 6364-6369., Roberson ED, et al, Science, 2007; 316:750-754, Nicholson AM, and Ferreira A, J Neurosci 2009; 29:4640-4651, Oakley H, J Neurosci 2006;26(40):10129-10140.).

Пассивную и активную иммунизацию против тау-белка анализировали на мышах с использованием нескольких разных мышинных моделей, включая разные фосфо-тау-пептиды для активной иммунизации и антитела к тау-белку для пассивной иммунотерапии (Asuni AA, et al, J Neurosci. 2007;27(34):9115-9129., Sigurdsson EM. Curr Alzheimer Res. 2009;6(5):446-450., Boutajangout A, et al, J Neurosci. 2010;30(49):16559-16566., Rosenmann H, et al. Arch Neurol. 2006;63(10):1459-1467., Boimel M, et al, Exp Neurol. 2010;224(2): 472-485.). Пассивная иммунизация с использованием хорошо изученных антител к тау-белку, которые вступают в реакцию с фосфорилированным Ser396 и Ser404 гиперфосфорилированного тау-белка на раннем патологическом конформационном эпитопе тау-белка, подтвердила результаты, полученные в исследованиях с активной иммунизацией. На мышах, обработанных этими антителами, было показано значительное снижение количества патологического тау-белка, которое измеряли посредством биохимических способов и гистологических методик, а также значительная отсрочка развития нарушения, связанного с потерей двигательной функции, которую оценивали в поведенческих тестах (Boutajangout A, et al, J Neurochem. 2011;118(4):658-667., Chai X, et al. J Biol Chem. 2011;286(39):34457-34467).

В настоящее время наиболее распространенным медицинским подходом является предоставление симптоматического лечения AD, которое не эффективно даже после нескольких лет лечения. Новые терапевтические подходы и стратегии в отношении AD должны выходить за рамки лечения симптомов, чтобы предотвращать снижение когнитивных функций и противодействовать основному патологическому процессу заболевания. В частности, существует необходимость в разработке молекул, которые либо самостоятельно, либо в сочетании с другими лекарственными средствами, нацеленными на AD, будут вмешиваться, по крайней мере, в

некоторые из самых ранних стадий заболевания. Такие молекулы будут предоставлять новые, выгодные возможности для ранней диагностики (что само по себе может улучшить результаты лечения), профилактики и лечения AD и других таупатий.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены новые связывающие молекулы, в частности, человеческие связывающие молекулы, например, человеческие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способные специфично связываться с тау-белком и способны подавлять скопление тау-белка.

В предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы содержат CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны подавлять скопление тау-белка *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы настоящего изобретения содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Предпочтительно связывающие молекулы согласно настоящему изобретению представляют собой человеческие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим по меньшей мере одну связывающую молекулу согласно настоящему изобретению и дополнительно содержащим по меньшей мере одну метку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим связывающие молекулы согласно настоящему изобретению.

Связывающие молекулы, иммуноконъюгаты и/или молекулы нуклеиновых кислот данного изобретения годятся для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения

в диагностике, профилактике и/или лечении таупатий, включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Альцгеймера (AD).

Изобретение также относится к функциональным вариантам связывающих молекул согласно настоящему изобретению.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей связывающую молекулу согласно настоящему изобретению и/или иммуноконъюгат, и фармацевтически приемлемый носитель или формообразующее.

Краткое описание графических материалов

ФИГ. 1: Измерение сродства (аффинности) с помощью изотермической титрационной калориметрии.

ФИГ. 2: Кривые скопления тау-белка *in vitro*.

ФИГ. 3: АСМ-изображения фибрилл huTau441.

ФИГ. 4: Подавление скопления тау-белка в контрольном эксперименте (А) и антителом антитела изобретения (В).

Определения

Как используется в контексте настоящего изобретения, термин "антигенсвязывающие фрагменты" означает части цельной связывающей молекулы, такой как антитело. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, F(ab'), F(ab')₂ и Fv фрагменты, CDR, антигенсвязывающий сайт, вариабельный участок тяжелой и легкой цепи, диатела, триотела, молекулы одноцепочечных антител (scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные по меньшей мере из двух интактных антител или их фрагментов, или (поли)пептиды, которые содержат по меньшей мере фрагмент иммуноглобулина, что является достаточным, чтобы придать антигену способность связываться с (поли)пептидом и т.д. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность как минимум из 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 или 250 повторяющихся аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности антитела. Антигенсвязывающие фрагменты можно получить путем синтеза или посредством ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов, или их можно получить генноинженерным путем с использованием методик рекомбинантной ДНК. Способы получения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в *Antibodies: A Laboratory Manual*, edited by: E. Harlow and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, которое включено в данный документ

посредством ссылки. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь один или несколько участков связывания. При наличии более одного участка связывания участки связывания могут быть идентичны друг другу или они могут отличаться.

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

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

"Каркас" или "каркасная последовательность" являются остальными последовательностями в пределах переменной области антитела, помимо тех, которые определены как последовательности антигенсвязывающего участка. Поскольку точное определение антигенсвязывающего участка можно получить при помощи множества методик картирования, как описано выше, точная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего участка.

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

Используемый в данном документе термин "специфичное связывание" или "специфичное распознавание", который относится к взаимодействию антитела с его партнером по связыванию, например, с антигеном, означает, что взаимодействие зависит от присутствия определенной аминокислотной последовательности или структуры, например, антигенной детерминанты или эпитопа, у партнера по связыванию. Другими словами, антитело предпочтительно связывается с партнером по связыванию или распознает его, даже если партнер по связыванию присутствует в смеси с другими

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

Используемый в данном документе термин "эпитоп" означает ту часть антигена, с которой контактируют петли CDR антитела. "Структурный эпитоп" состоит из приблизительно 15-22 контактных остатков на поверхности антигена и включает много аминокислотных остатков, которые контактируют с большой группой остатков в CDR, совместно именуемых паратопом антитела. Непосредственный контакт между остатками эпитопа и паратопа осуществляется посредством электростатических сил, таких как водородные связи, солевые мостики, ван-дер-ваальсовы силы на гидрофобных поверхностях и геометрическая комплементарность. Зона взаимодействия имеет также связанные молекулы воды или другие кофакторы, которые способствуют специфичности и аффинности взаимодействий антиген-антитело. Энергия связывания комплекса антиген-антитело в основном опосредована небольшой совокупностью контактных остатков в зоне взаимодействия эпитопа-паратопа. Данные "остатки, важные с точки зрения энергии связывания" часто находятся в центре зоны взаимодействия эпитопа-паратопа и составляют функциональный эпитоп. Контактные остатки на периферии зоны взаимодействия, как правило, вносят незначительные вклады в энергию связывания; при этом их замены зачастую слабо влияют на связывание с антигеном. Таким образом, связывание или функциональная активность эпитопа предусматривает

небольшую совокупность остатков, важных с точки зрения энергии связывания, расположенных в центре структурного эпитопа, с которыми контактируют CDR, определяющие специфичность. Определение функционального эпитопа на антигенном белке можно произвести с использованием нескольких способов, включая аланин-сканирующий мутагенез, или путем определения кристаллической структуры антигена с использованием антитела. Эпитоп может быть линейным по своей природе или прерывистым эпитопом, например, конформационным эпитопом, который образован посредством пространственных взаимоотношений между несмежными аминокислотами антигена, а не линейным рядом аминокислот. Конформационный эпитоп предусматривает эпитопы, возникшие вследствие укладки антигена, при которой аминокислоты из различных участков линейной последовательности антигена находятся в непосредственной близости в 3-мерном пространстве. Для прерывистых эпитопов возможно получить связывание одного или нескольких линейных пептидов с уменьшенной аффинностью к так называемому частичному эпитопу, например, распределенному по разным областям последовательности белка (Cragg, M. S. (2011) *Blood* 118 (2): 219-20.).

Используемый в данном документе термин "аффинность" относится к степени силы связывания отдельного эпитопа или частичного эпитопа с CDR связывающей молекулы, например, молекулы иммуноглобулина; см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) на страницах 27-28. Используемый в данном документе термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть к объединенной силе функционального взаимодействия смеси иммуноглобулинов с антигеном; см., например, Harlow на страницах 29-34. Авидность связана как с аффинностью отдельных молекул иммуноглобулина в популяции со специфичными эпитопами, так и с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между бивалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся структурой эпитопа, например, полимером, будет характеризоваться высокой авидностью. Аффинность или авидность антитела к антигену можно определить экспериментально с использованием подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" в *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York,

N.Y. (1984), Kuby, Janisimmunology, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способов, описанных в данном документе. Общие методики измерения аффинности антитела к антигену включают ELISA, RIA и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренная аффинность определенного взаимодействия антитело-антиген может варьироваться при измерении в разных условиях, например, концентрация солей, pH. Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров, например, KD, IC50, предпочтительно проводят со стандартными растворами антитела и антигена и стандартным буфером.

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

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В случае ДНК, полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обычно может содержать промотор и/или другие элементы контроля транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Функциональная связь наблюдается, когда область, кодирующая продукт гена, например, полипептид, ассоциирована с одним или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия продукта гена находилась под влиянием или контролем регуляторной последовательности(ей). Таким образом, промоторная область будет функционально связанной с нуклеиновой кислотой, которая кодирует полипептид, если промотор был способен к осуществлению транскрипции этой нуклеиновой кислоты.

Промотор может являться клеточноспецифичным промотором, который управляет транскрипцией ДНК на существенном уровне только в предварительно определенных клетках. Другие элементы контроля транскрипции, кроме промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминции транскрипции, могут быть функционально связанными с полинуклеотидом для управления клеточноспецифичной транскрипцией. В данном документе раскрыты подходящие промоторы и другие области контроля транскрипции.

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

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

Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предложены связывающие молекулы, например, антитела и/или его антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с тау-белком и способны подавлять скопление тау-белка, где

связывающие молекулы содержат CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В определенном варианте осуществления связывающие молекулы настоящего изобретения содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Согласно настоящему изобретению предложены новые связывающие молекулы, которые специфично связывают тау-белок с высоким сродством, и которые способны подавлять преобразование рекомбинантного тау-белка в PHF-подобные скопления. В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны подавлять преобразование рекомбинантного тау-белка в PHF-подобные скопления *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы связывают тау-белок со сродством, составляющим 20 нм или меньше, предпочтительно - 15 нм или меньше.

Тау-белок является часто встречающимся белком центральной и периферической нервной системы, характеризующимся множеством широко известных изоформ. В центральной нервной системе (ЦНС) человека по причине альтернативного сплайсинга существуют шесть основных изоформ тау-белка, которые варьируются по размеру от 352 до 441 (Hanger, et al. Trends Mol Med 15:112-9, 2009). Эти изоформы отличаются одна от другой по подвергнутому регуляции включению 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 тандемно расположенных повторов, связывающихся с микротрубочками, и при этом они упоминаются как ON3R, 1N3R, 2N3R, ON4R, 1N4R и 2N4R. Под рекомбинантным тау-белком в данном документе понимают тау-изоформу с SEQ ID NO: 9. Тау-белок может быть рекомбинантно экспрессирован в больших количествах, например, в *E. coli*, бакуловирусе, млекопитающем или бесклеточных системах. Рекомбинантный тау-белок можно рекомбинантно экспрессировать и очищать, используя стандартные способы (например, Barghorn, et

al 2005, Meth Mol Biol 35-51), или как описано в Примере 1.

В варианте осуществления связывающие молекулы данного изобретения, такие как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связываются с нефосфорилированным тау-пептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекула данного изобретения специфично связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 299-318 тау-белка.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекула данного изобретения специфично связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 299-318 тау-белка с последовательностью SEQ ID NO: 9.

Тау-белок связывает микротрубочки и регулирует транспорт груза в клетках, процесс, который может модулироваться с помощью фосфорилирования тау-белка, которое наблюдается в случае многих из 79 потенциальных сайтов фосфорилирования серина (Ser) и треонина (Thr). Тау-белок подвергается высокому уровню фосфорилирования в ходе развития головного мозга. Степень фосфорилирования снижается в зрелом возрасте. Некоторые сайты фосфорилирования расположены в пределах доменов связывания микротрубочек тау-белка, и было показано, что повышение уровня фосфорилирования тау-белка приводит к отрицательной регуляции связывания микротрубочек. Например, Ser262 и Ser396, которые расположены в пределах мотивов связывания микротрубочек или примыкают к ним, являются гиперфосфорилированными в тау-белках аномальных спаренных спиральных филаментов (PHF), основном компоненте нейрофибриллярных клубков (NFT) в головном мозге пациентов с AD. Используемый в данном документе термин "спаренный спиральный филамент тау-белка" или "PHF-тау-белок", относится к широко известным скоплениям тау-белка, которые составляют патологические структуры, называемые нейрофибриллярными клубками (NFT), впервые описанные Альцгеймером в головном мозге пациента с деменцией. Они также присутствуют при многих других заболеваниях, известных как таупатии. Термин "нейрофибриллярный клубок" (NFT) относится к патологическим структурам, впервые описанным Альцгеймером в головном мозге пациента с деменцией. NFT состоит из упорядоченно расположенных субъединиц, которые называются спаренными спиральными филаментами, скоплениями гиперфосфорилированного

белка тау, которые наиболее широко известны как основной маркер болезни Альцгеймера.

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

Согласно данному изобретению предложены новые связывающие молекулы, которые специфично связываются с тау-белком и способны подавлять образование скоплений тау-белка. Так, связывающие молекулы данного изобретения могут служить в качестве возможных терапевтических реагентов, предотвращающих образование таупатии, в качестве биомаркеров для оценки рисков развития AD или реагентов, применяемых для фиксации биомаркеров, которые используются для оценки рисков развития AD.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению могут представлять собой интактные молекулы иммуноглобулина, такие как моноклональные антитела, или связывающие молекулы могут представлять собой их антиген-связывающие фрагменты, включая, но без ограничения, переменные участки тяжелых и легких цепей,

Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd фрагменты, фрагменты, представляющие собой определяющие комплементарности участки (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела, одноцепочечные фаговые антитела, диатела, триатела, тетратела и (поли)пептиды, которые содержат по меньшей мере фрагмент иммуноглобулина, который достаточен для придания специфичного связывания с антигеном тау-белка.

В предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению представляют собой моноклональные антитела человека и/или их антигенсвязывающие фрагменты. Связывающие молекулы также могут представлять собой нанотела, альфатела, антитела по типу affibody, остовы доменов FN3 и другие остовы на основе доменов в содержащих повторы белках (человека), по типу Adnectins, Anticalins, Darpins, Centyrins и т. д. или другие остовы, содержащие связывающиеся с эпитопом последовательности.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одну связывающую молекулу по настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает иммуноконъюгаты, т. е. молекулы, содержащие по меньшей мере одну обозначенную в настоящем документе связывающую молекулу и дополнительно содержащие по меньшей мере одну метку. Метка (метки) может быть непосредственно присоединена к связывающим молекулам/конъюгирована с ними посредством ковалентного связывания. Альтернативно, метка (метки) может быть присоединена к связывающим молекулам/конъюгирована с ними посредством одного или нескольких сшивающих соединений. Методики конъюгирования меток со связывающими молекулами хорошо известны специалистам в данной области. Метки иммуноконъюгатов по настоящему изобретению могут представлять собой терапевтические средства, но также они могут представлять собой выявляемые фрагменты/средства. Метками, подходящими при терапии и/или предупреждении, могут быть токсины или их функциональные части, антибиотики, ферменты, другие связывающие молекулы, которые повышают фагоцитоз и иммуностимуляцию. Иммуноконъюгаты, содержащие поддающееся обнаружению вещество можно применять для диагностических целей, например, для определения того, идет ли процесс развития AD у субъекта. Поддающееся обнаружению

фрагменты/вещества включают, но не ограничиваются ими, ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминисцентные материалы, биолюминисцентные материалы, радиоактивные материалы, металлы, испускающие позитроны, и нерадиоактивные ионы парамагнитных металлов. Метки, применяемые для мечения связывающих молекул для связанных с обнаружением, и/или аналитических, и/или диагностических целей, зависят от конкретных применяемых связанных с обнаружением/аналитических/диагностических методик и/или способов, таких как, помимо прочих, иммуногистохимическое окрашивание образцов (ткани), обнаружение с помощью проточной цитометрии, обнаружение с помощью сканирующей лазерной цитометрии, флуоресцентные иммуноанализы, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), радиоиммунологические анализы (RIA), биоанализы (например, анализы фагоцитоза), применения вестерн-блоттинга и т.д. Подходящие метки для связанных с обнаружением/аналитических/диагностических методик и/или способов хорошо известны из уровня техники и доступны специалистам в данной области.

Другой аспект настоящего изобретения заключается в получении молекул нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере связывающую молекулу, функциональный вариант или иммуноконъюгат согласно настоящему изобретению. Такие молекулы нуклеиновых кислот можно применять в качестве промежуточных продуктов с целью клонирования, например, в описанном выше процессе созревания аффинности. Согласно предпочтительному варианту осуществления молекулы нуклеиновых кислот представляют собой выделенные или очищенные молекулы. Специалист в данной области техники поймет, что функциональные варианты данных молекул нуклеиновых кислот также предусматриваются как часть настоящего изобретения. Функциональные варианты представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые могут непосредственно транслироваться с помощью стандартного генетического кода с получением аминокислотной последовательности, идентичной транслированной с исходных молекул нуклеиновых кислот.

Другим аспектом настоящего изобретения является предоставление полинуклеотидов, например, векторов, содержащих одну или несколько молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Векторы могут быть получены из плазмид,

таких как, помимо прочих, F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti и т.д.; космид, фагов, таких как лямбда, лямбдоидный, M13, Mu, P1, P22, Q β , T-четный, T-нечетный, T2, T4, T7 и т.д.; растительных вирусов. Векторы можно применять для клонирования и/или для экспрессии связывающих молекул по настоящему изобретению и даже можно применять для генной терапии. Также настоящим изобретением охватываются векторы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, функционально связанные с одной или несколькими регулирующими экспрессию молекулами нуклеиновых кислот. Выбор вектора зависит от соблюдаемых процедур рекомбинации и используемого хозяина. Введение векторов в клетки-хозяева может быть произведено с помощью, помимо прочего, трансфекции с использованием фосфата кальция, инфицирования вирусами, трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном, трансфекции с использованием липофектамина или электропорации. Векторы могут автономно реплицироваться или могут реплицироваться вместе с хромосомой, в которую они были интегрированы. Предпочтительно, векторы содержат один или несколько маркеров для отбора. Выбор маркеров может зависеть от выбранных клеток хозяев, хотя это не является решающим для настоящего изобретения, что хорошо известно специалистам в данной области. Они включают без ограничения канамицин, неомицин, пурамицин, гигромицин, зеоцин, ген тимидин-киназы из вируса простого герпеса (HSV-TK), ген дигидрофолат-редуктазы из мыши (dhfr). Векторы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих связывающие молекулы человека, которые описаны выше, функционально связанные с одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими белки или пептиды, которые можно использовать для выделения связывающих молекул человека, также охватываются настоящим изобретением. Эти белки или пептиды включают без ограничения глутатион-S-трансферазу, мальтоза-связывающий белок, металл-связывающий полигистидин, зеленый флуоресцентный белок, люциферазу и бета-галактозидазу.

Хозяева, содержащие одну или несколько копий вышеупомянутых векторов, представляют собой дополнительный аспект настоящего изобретения. Предпочтительно, хозяева представляют собой клетки-хозяева. Клетки-хозяева включают, но без ограничения, клетки, происходящие из млекопитающего, растения, насекомого, клетки грибного или бактериального происхождения. Бактериальные клетки

включают без ограничения клетки из грамположительных бактерий или грамотрицательных бактерий, таких как некоторые виды из рода *Escherichia*, как например, *E. coli*, и *Pseudomonas*. В группе грибных клеток предпочтительно используют клетки дрожжей. Экспрессии в дрожжах можно достичь при использовании штаммов дрожжей, таких как, помимо прочего, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Hansenula polymorpha*. Более того, в качестве клеток-хозяев можно использовать клетки насекомых, такие как клетки из *Drosophila* и Sf9. Помимо этого, клетки хозяева могут представлять собой растительные клетки, такие как, помимо прочего, клетки из сельскохозяйственных растений, таких как лесные растения, или клетки из растений, обеспечивающих питательные и сырьевые материалы, таких как зерновые растения, или лекарственных растений, или клеток из декоративных растений, или клеток из цветочных луковичных культур. Трансформированные (трансгенные) растения или растительные клетки получают с помощью известных способов, например, опосредованного *Agrobacterium* переноса генов, трансформации листовых дисков, трансформации протопластов с помощью вызванного полиэтиленгликолем переноса ДНК, электропорации, обработки ультразвуком, микроинъекции или биолистического переноса генов. Кроме того, подходящая система экспрессии может представлять собой бакуловирусную систему. Системы экспрессии, использующие клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS, клетки BHK, клетки NSO или клетки меланомы Боуэса, являются предпочтительными в настоящем изобретении. Клетки млекопитающих обеспечивают экспрессируемые белки с посттрансляционными модификациями, которые являются наиболее подобными природным молекулам, происходящим из млекопитающих. Поскольку настоящее изобретение касается молекул, которые можно вводить людям, особенно предпочтительной будет человеческая система экспрессии. Таким образом, даже более предпочтительно, клетки-хозяева представляют собой клетки человека. Примерами клеток человека являются, помимо прочего, клетки HeLa, 911, AT1080, A549, 293 и HEK293T. Согласно предпочтительным вариантам осуществления человеческие клетки-продуценты содержат по меньшей мере функциональную часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аденовирусный участок E1 в экспрессируемом формате. Согласно еще более предпочтительным вариантам осуществления указанные клетки-

хозяева получены из сетчатки человека и иммортализованы нуклеиновыми кислотами, содержащими последовательности из аденовируса E1, такими как клетки 911 или клеточная линия, депонированная в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), CAMR, Солсбери, Уилтшир SP4 OJG, Великобритания, 29 февраля 1996 года под номером 96022940 и представленная на рынке под торговым названием PER.C6® (PER.C6 является зарегистрированным торговым названием Crucell Holland B.V.). В контексте данной заявки "клетки PER.C6" относятся к клеткам, депонированным под номером 96022940, или к их предшественникам, более ранним или более поздним линиям, а также к потомкам предшественников депонированных клеток, а также к производным любого из упомянутого выше. Получение рекомбинантных белков в клетках-хозяевах можно осуществлять согласно способам, известным из уровня техники. Применение клеток, представленных на рынке под торговым названием PER.C6®, в качестве платформы для получения белков, представляющих интерес, было описано в документе WO 00/63403, раскрытие которого в полном объеме включено в данный документ путем ссылки.

Способ получения связывающей молекулы согласно настоящему изобретению представляет собой дополнительный аспект настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления способ включает стадии а) культивирования хозяина согласно настоящему изобретению в условиях, приспособленных для экспрессии связывающей молекулы и б) необязательно извлечения экспрессированной связывающей молекулы. Экспрессированные связывающие молекулы можно извлекать из бесклеточных экстрактов, но предпочтительно их извлекают из среды культивирования. Вышеописанный способ получения также можно использовать для создания функциональных вариантов связывающих молекул и/или иммуноконъюгатов согласно настоящему изобретению. Способы извлечения белков, таких как связывающие молекулы, из бесклеточных экстрактов или среды культивирования хорошо известны специалисту в данной области техники. Связывающие молекулы, функциональные варианты и/или иммуноконъюгаты, получаемые с помощью вышеописанного способа, также являются частью настоящего изобретения.

В качестве альтернативы, после экспрессии в хозяевах, таких как клетки-хозяева, связывающие молекулы и иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению можно получать путем синтеза с

использованием общепринятых синтезаторов пептидов или в бесклеточных трансляционных системах с использованием нуклеиновой кислоты РНК, полученной из молекул ДНК согласно настоящему изобретению. Связывающие молекулы и иммуноконъюгаты, которые можно получать с помощью вышеописанных способов получения с помощью синтеза или бесклеточных трансляционных систем, также являются частью настоящего изобретения.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие по меньшей мере связывающую молекулу, предпочтительно моноклональное антитело человека, согласно настоящему изобретению, по меньшей мере ее функциональный вариант, по меньшей мере иммуноконъюгат согласно настоящему изобретению и/или их комбинацию. В дополнение к этому композиции могут содержать, помимо прочего, стабилизирующие молекулы, такие как альбумин или полиэтиленгликоль, или соли. Предпочтительно, применяемые соли представляют собой соли, которые сохраняют желаемую биологическую активность связывающих молекул и не придают каких-либо нежелательных токсикологических эффектов. Если необходимо, связывающие молекулы человека согласно настоящему изобретению могут быть заключены в материал или нанесены в виде покрытия на материал для защиты их от действия кислот или других естественных условий или условий, не относящихся к естественным, которые могут инактивировать связывающие молекулы.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие по меньшей мере молекулу нуклеиновой кислоты, которая определена в настоящем изобретении. Композиции могут содержать водные растворы, такие как водные растворы, содержащие соли (например, NaCl или соли, которые описаны выше), детергенты (например, SDS) и/или другие подходящие компоненты.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере связывающую молекулу, такую как моноклональное антитело человека, согласно настоящему изобретению (или его функциональный фрагмент или вариант), по меньшей мере иммуноконъюгат согласно настоящему изобретению, по меньшей мере композицию согласно настоящему изобретению или их комбинации. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одно фармацевтически

приемлемое формообразующее или носитель. Фармацевтически приемлемые формообразующие и носители хорошо известны специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно другое профилактическое и/или терапевтическое средство. Такие средства могут представлять собой связывающие молекулы, малые молекулы, органические или неорганические соединения, ферменты, последовательности полинуклеотидов и т.п. Их можно применять в комбинации со связывающими молекулами настоящего изобретения. Выражение "в комбинации" в данном документе означает одновременно в виде отдельных составов или в виде одного комбинированного состава, или в соответствии со схемой последовательного введения в виде отдельных составов в любом порядке.

Согласно определенным вариантам осуществления связывающие молекулы предназначены для применения с целью подавления и/или предотвращения образования скоплений тау-белка.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы предназначены для применения в качестве лекарственного препарата и предпочтительно для применения в диагностике, терапевтическом и/или профилактическом лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как AD. Так, связывающие молекулы настоящего изобретения или их фрагменты можно использовать для лечения, уменьшения или предупреждения симптомов у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, которое предполагает накопление тау-белка или патологического тау-белка или скоплению тау-белка в пределах головного мозга, например, у пациентов, страдающих AD, а также любой другой таупатией или другой патологией, связанной с тау-белком, при которой может сверхэкспрессироваться тау-белок. Без ограничения конкретной теорией предполагается, что связывающие молекулы настоящего изобретения могут производить благоприятный эффект за счет уменьшения или устранения патологического тау-белка или скопления тау-белка и, следовательно, количества PHF-тау-белка в головном мозге. Связывающие молекулы настоящего изобретения можно применять для лечения пациента-животного, относящегося к любой систематической группе. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения

является способ подавления и/или предотвращения образования скоплений тау-белка.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения или уменьшения симптомов нейродегенеративного заболевания, которое предполагает скопление тау-белка у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества связывающей молекулы настоящего изобретения в течение времени, достаточного для лечения или уменьшения симптомов нейродегенеративного заболевания. В любом из указанных выше вариантов осуществления нейродегенеративное заболевание, которое предполагает скопление тау-белка, является таупатией. Используемый в данном документе термин "таупатия" охватывает любое нейродегенеративное заболевание, которое предполагает патологическую скопление тау-белка в пределах головного мозга. В дополнение к семейной и спорадической AD, другими иллюстративными таупатиями являются лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий подкорковый глиоз, деменция, характеризующаяся только клубками, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс боковой амиотрофический склероз-паркинсонизм-деменция, синдром Дауна, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Галлервордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, мультисистемная атрофия, болезнь Ниманна-Пика типа C, прион-протеинцеребральная амилоидная ангиопатия, подострый склерозирующий лейкоэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуанаминная болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как деменция боксеров (болезнь боксеров). (Morris, et al. Neuron 70:410-26, 2011).

Поведенческий фенотип, связанный с тау-белком, включает когнитивные нарушения, ранее изменение личности и расторможенность, апатию, абулию, мутизм, апраксию, персеверацию, стереотипные движения/стереотипное поведение, гиперорализм, неорганизованность, неспособность планировать или организовывать последовательные задания, эгоизм/бесчувственность, антисоциальные черты, отсутствие

эмпатии, запинание, неграмотную речь с частыми инверсионными ошибками, но относительно сохранившимся пониманием, нарушение понимания и нехватку словарного запаса, медленно прогрессирующую нестабильность походки, ретропульсию, замирание, частое падение, аксиальную ригидность, нечувствительную к леводопе, надъядерный паралич взора, подергивания глазных яблок с прямоугольным сигналом, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, потерю кортикальной чувствительности и тремор.

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

Связывающие тау-белок молекулы настоящего изобретения пригодны в качестве как терапевтического, так и профилактического средства для лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний, которые предполагают накопление тау-белка и/или патологическое скопление тау-белка, таких как AD, или другие таупатии, или болезни, ассоциированные с тау-белком. У пациентов, у которых не наблюдаются симптомы, лечение можно начинать в любом возрасте (например, в возрасте приблизительно 10, 15, 20, 25, 30 лет). Как правило, однако, не обязательно начинать лечение до тех пор, пациент не достигнет приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно

предусматривает многократные дозы в течение некоторого периода времени. Лечение можно контролировать путем осуществления анализа ответов с участием антител, или активированных Т-клеток, или В-клеток в отношении терапевтического средства в зависимости от времени. Если уровень ответа понижается, назначается введение бустерной дозы.

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

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

В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний также возникает способ терапии путем иммуномодуляции для устранения агрегированных форм белка α -синуклеина. Комбинированная терапия, которая нацелена на устранение как тау-белка, так и белка α -синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем целенаправленное воздействие на каждый белок в отдельности. В способах настоящего изобретения "терапевтически эффективное количество" связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, для лечения или уменьшения тяжести симптомов таупатии можно определить с помощью стандартных методик исследования. Например, дозу антитела можно определить путем введения средства соответствующим животным моделям, хорошо известным из уровня техники.

Кроме того, для определения оптимальных диапазонов доз можно необязательно использовать анализы *in vitro*. Специалисты в данной области техники могут сделать выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических исследований) с учетом нескольких факторов. Такие факторы включают заболевание, которое подлежит лечению или предупреждению, связанные с ним симптомы, массу тела пациента, иммунный статус пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области техники. Точная доза для использования в составе также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания, и она должна быть определена в соответствии с заключением лечащего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать исходя из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на животных моделях. Способ введения связывающих молекул настоящего изобретения для терапевтического применения может представлять собой любой подходящий путь, посредством которого средство доставляют хозяину. Фармацевтические композиции на основе этих связывающих молекул пригодны для парентерального введения, например, внутрикожного, внутримышечного, внутрибрюшинного, внутривенного, подкожного, интраназального или внутричерепного, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного мозга или спинного мозга.

Лечение можно проводить в режиме введения с одной дозой или в режиме введения с несколькими дозами, при котором исходный курс лечения может состоять из 1-10 отдельных доз, с последующими другими дозами, вводимыми в последующие временные

интервалы, которые необходимы для поддержания и/или усиления ответа, например, через 1-4 месяца вводят вторую дозу и, при необходимости, последующую(ие) дозу(ы) через несколько месяцев. Примеры приемлемых схем лечения включают: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7 день и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев, или другие схемы, достаточные для получения необходимых ответов, которые, как ожидается, приведут к уменьшению симптомов заболевания или уменьшению тяжести заболевания. Таким образом, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной буферной воды и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мкг, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мкг или от приблизительно 5 мкг до приблизительно 25 мкг антитела по настоящему изобретению. Подобным образом, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для внутривенной инфузии можно получить с содержанием приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и от приблизительно 1 мкг до приблизительно 30 мкг или от приблизительно 5 мкг до приблизительно 25 мкг антитела по настоящему изобретению. Широко известны актуальные способы получения композиции для парентерального введения, которые более подробно описаны, например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Связывающие молекулы настоящего изобретения можно лиофилизировать для хранения и повторно растворять в подходящем носителе непосредственно перед использованием. Было показано, что эта методика эффективна в случае антитела и других препаратов, содержащих белки, и при этом можно использовать известные из уровня техники методики лиофилизации и восстановления.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие молекулы можно использовать в способах диагностики AD или другой таупатии у субъекта. Этот способ включает обнаружение у субъекта присутствия тау-белка с помощью диагностического реактива, такого как антитело или его фрагмент по настоящему изобретению. Тау-белок можно обнаружить в биологическом образце от субъекта (например, в крови, моче, спинномозговой жидкости) посредством приведения в контакт биологического образца с диагностическим реактивом, представляющим собой антитело, и обнаружения связывания диагностического реагента, представляющего собой

антитело, с PHF-тау-белком в образце от субъекта. Анализы для осуществления обнаружения включают хорошо известные способы, такие как ELISA, иммуногистохимия, вестерн-блоттинг или *in vivo* визуализация.

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

Способы диагностики, описанные выше, можно также использовать для контроля ответа субъекта на терапию путем обнаружения присутствия тау-белка у субъекта до, во время или после лечения. Изменение значений может быть по отношению к исходному уровню сигналов для ответа на лечение. Значения также могут временно изменяться в биологических жидкостях по мере того, как головной мозг очищается от патологического тау-белка.

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

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

ПРИМЕР 1

Экспрессия и очистка белка

huTau441 (SEQ ID NO: 9) – наиболее длинную изоформу тау-белка, содержащую как N-концевые вставки, так и все четыре мотива связывания микротрубочек, экспрессировали в бактериальном штамме E.Coli BL21 (DE3) следующим образом: 10 л культурального бульона 2YT Broth culture инкубировали при 37 °C плотности OD600=1,0. IPTG добавляли до 1 mM и культуры инкубировали еще 3 часа. Бактериальные клетки собирали центрифугированием и повторно суспендировали в PBS для удаления остаточной надосадочной жидкости. После центрифугирования полученные капли осадка хранили при -80 °C до проведения очистки.

Капли осадка повторно суспендировали в 5 мл/г буфера для лизиса осадка после центрифугирования [Bugbuster mastermix, Merck-Millipore) плюс ингибиторы протеазы Complete Ultra без EDTA (Roche) и дополнительных 500Ед Benzonase (Merck-Millipore). Через 30 мин при комнатной температуре лизат подвергали тепловой обработке при 70 °C в течение 60 мин. Выпавший в осадок материал удаляли центрифугированием и растворимый тау-белок выделяли аффинной хроматографией, пропуская через колонку Ni Sepharose Excel (GE), а затем через C-Tag (Life Technologies) и применяли гель-фильтрацию через колонку Superdex 200 на (Akta Avant 25, GE). Аликвоту каждой фракции, содержащей белок, подвергали анализу SDS – PAGE и фракции с наименьшим содержанием примесей (полосы выше или ниже, чем мономер тау-белка) сохраняли для экспериментальных целей. Во всех случаях препарат содержал

> 95% мономера тау-белка согласно результатам SEC-MALS.

Измерения сродства связывания

Сродство связывающих молекул настоящего изобретения определяли, используя изотермический титровальный калориметр Microcal Auto-iTC200 (Malvern). Тау-белок и антитела к тау-белку подвергали диализу в PBS, pH 7,4, чтобы обеспечить условия подбора идеального буфера. Тау-белок (пептид) при 20 мкМ немедленно титровали, используя исходный стандартный раствор СВТАУ-27.1 с 200 мкМ в PBS, и изменения энтальпии оценивали после каждого впрыска. Аппроксимацию данных проводили согласно модели одного множества сайтов, используя аналитическую программу Microcal PEAQ-ITC Analysis Software (Malvern). Результаты показаны на фигуре 1.

Тау-пептид, включающий в себя остатки в положениях 299-318, титровали, используя СВТАУ27.1 (как описано в WO2015/197820)

(рисунок слева) или антитело настоящего изобретения. Изменения энтальпии при каждом впрыске показаны как функция молярного отношения IgG/тау-белка (о). Непрерывные линии представляют собой сглаживание данных связывания в соответствии с моделью "одного множества связывающих сайтов". Равновесные константы диссоциации, полученные в результате сглаживания, показаны в правых нижних углах каждого рисунка.

Как видно, антитело настоящего изобретения демонстрирует более крутую кривую связывания, чем у СВТАУ-27.1, что говорит о значительном количественном улучшении сродства связывания. Так, константа диссоциации, характеризующая взаимодействие антител с пептидом, повысилась от 675 нМ для СВТАУ27.1 до 12,8 нМ для антитела данного изобретения.

Исследование скопления in vitro

huTau441 (15 мкМ) инкубировали в PBS, pH 7,4 с гепарином (8 мкМ) в качестве инициатора преобразования и тιοфлавина Т (ThT) (50 мкМ) в качестве флуоресцентного зонда процесса скопления (агрегации). За скоплением наблюдали в непрерывном режиме при орбитальном встряхивании (425 цикл/мин, 3 мм) при 37 °С в формате микропланшета (Synergy Neo2, BioTek). Процесс скопления тау-белка оценивали каждые 15 минут путем регистрации испускаемой флуоресценции ThT при 485 нм (ширина полосы 20 нм) при возбуждении 440 нм (ширина полосы 20 нм). Результаты показаны на фигуре 2.

Высокая воспроизводимость результатов была продемонстрирована на четырех повторностях исследования процесса преобразования. Было показано, что спонтанное преобразование rTau хорошо воспроизводится. Характер полученных данных кинетики был сигмоидальным с хорошо определяемой латентной фазой, за которой следовал экспоненциальный рост, как это и ожидается в случае механизма полимеризации на активных центрах. В заключение, это показывает, что была разработана хорошо воспроизводимая методика анализа, при котором мономерный рекомбинантный тау-белок преобразуется в ThT-положительные волокна. Этот анализ использовали для наблюдения за подавляющим (ингибирующим) действием mAb СВТАУ.

Атомно-силовая микроскопия

Образцы преобразованного белка наносили на подложку из свежерасслоенной слюды. Через 2-3 мин поверхность основательно промывали сверхчистой водой, чтобы удалить соли и несвязанный

белок. Образец затем сушили в потоке воздуха и закрепляли на сканере микроскопа. Изображения регистрировали в полуконтактном режиме работы атомно-силового микроскопа Digital Instruments Multimode, оборудованном управляющим устройством Nanoscope IV и сканером E-типа (Bruker). Все изображения получали, используя однолучевой кремниевый зонд с номинальной постоянной пружины 40 Н/м и номинальным радиусом кривизны 10 нм. Результаты показаны на фигуре 3.

На Фиг. 3(А) показано изображение с малым увеличением, демонстрирующее большое количество фибрилл и их разнообразную длину. Фиг. 3(В) представляет собой сильно увеличенное изображение отдельных фибрилл, характеризующее их морфологию. Фибриллы получали инкубированием белка 37°C в PBS, pH 7,4.

Как можно заметить, наблюдаются только фибриллярные скопления, а фон образца выглядит очень чистым и не содержит аморфных структур, что говорит об отсутствии каких-либо параллельных процессов. В увеличенном изображении справа наблюдаются четкие клубковые структуры, что указывает на то, что в нашем исследовании *in vitro* образовывались волокна из тау-белка, морфология которых сходна с морфологией спаренных с тау-белком спиральных филаментов, выделенных из головного мозга с AD.

Функциональные характеристики mAb CBTAU

huTau441 (15 мкМ) инкубировали в PBS, pH 7,4 с гепарином (8 мкМ) в качестве инициатора преобразования и теофлавина Т (50 мкМ) в качестве флуоресцентного зонда процесса скопления (агрегации) в отсутствие или в присутствии 3–9 мкМ вариантов СВТАУ-27.1. За скоплением (агрегацией) наблюдали в непрерывном режиме при орбитальном встряхивании (425 цикл/мин, 3 мм) при 37 °C в формате микропланшета (Synergy Neo2, BioTek). Процесс скопления тау-белка оценивали каждые 15 минут путем регистрации испускаемой флуоресценции ThT при 485 нм (ширина полосы 20 нм) при возбуждении 440 нм (ширина полосы 20 нм).

На Фигуре 4, период времени скопления (агрегации) huTau441 (15 мМ) показан в отсутствие и в присутствии IgG под наблюдением с помощью флуоресценции ThT. Концентрации IgG, соответствующие каждому эксперименту, показаны рядом с каждой отдельной кривой. Антитело согласно настоящему изобретению (В) демонстрирует значительное улучшение эффективности блокирования скопления тау-белка по сравнению с СВТАУ-27.1(А). При том, что в случае СВТАУ-

27.1 наблюдается дозозависимое частичное подавление (ингибирование), выражаемое увеличенным периодом латентной фазы и более низкими конечными значениями для ThT, подавляющее (ингибирующее) действие, наблюдаемое в случае антитела настоящего изобретения, значительно более выражено и характеризуется полным подавлением скопления тау-белка при концентрации антитела 9 мкМ. Эффекта на преобразование huTau441 в присутствии отрицательного контроля не наблюдалось (данные не показаны).

Эти результаты указывают на то, что сродство CBTAU-27.1 к тау-белку напрямую коррелирует с его эффективностью в отношении блокирования скопления тау-белка, и на то, что увеличение сродства антитела настоящего изобретения в 50 раз, как оказалось, значительно увеличивает способность антитела блокировать процесс скопления тау-белка.

Последовательности:

	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
HC	DYWTA (1)	IYSGDSDTRYHPSVQG (2)	LDARVDAGWQLDS (3)
LC	KSSQSVFYRDNNKNYLA (4)	WASSRES (5)	QHYFNIPHN (6)

Вариабельный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO 7):
 QVQLVESGPEMRKPGESLKISCKTSGYIFSDYWTAWVRQLPGKGLQWMGIYSGDSDTRYHPSV
 QGHVTMSTDSSLTTAYLQWSSLKASDTGIYYCARLDARVDAGWQLDSWGQGTTLVTVSS

Вариабельный участок легкой цепи (SEQ ID NO 8):

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYRDNNKNYLAWYQHKSGQPPKLLFFWASS
 RESGVSDRFSGSGSGTDFTLTIDNLQAEDVALYYCQHYFNIPHNFGQGTKLEIK

SEQ ID NO 9:

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEGDGSEEP
 GSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVT
 QARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGE
 PPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMP
 DLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL
 SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGNKKIETHKLTFR
 ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVGDTSPRHLSNVSTGSIDMVDSPQLATLADEVSAASLAKQGL

SEQ ID NO 10:

²⁹⁹HVPGGGSVQIVYKPVDSLKV

SEQ ID NO 11:

²⁹⁹HVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI
 THVPGGGNK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, способная специфично связываться с тау-белком, содержащая:

CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,

CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3,

CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и

CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где связывающая молекула способна подавлять скопление (агрегацию) тау-белка.

2. Связывающая молекула по п.1, содержащая переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

3. Связывающая молекула, которая иммуноспецифично конкурирует при связывании с тау-белком со связывающей молекулой по п.1 или п.2.

4. Связывающая молекула по пп. 1, 2 или 3, представляющая собой моноклональное антитело человека или его антиген-связывающий фрагмент.

5. Связывающая молекула по любому из пп. 1-4 для применения в целях подавления скопления тау-белка.

6. Связывающая молекула по любому из пп. 1-4 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в диагностике, профилактике и/или лечении нейродегенеративных заболеваний, при которых происходит накопление тау-белка, и/или патологического скопления тау-белка.

7. Связывающая молекула по любому из пп. 1-4 для применения по п.5 или п.6, где нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

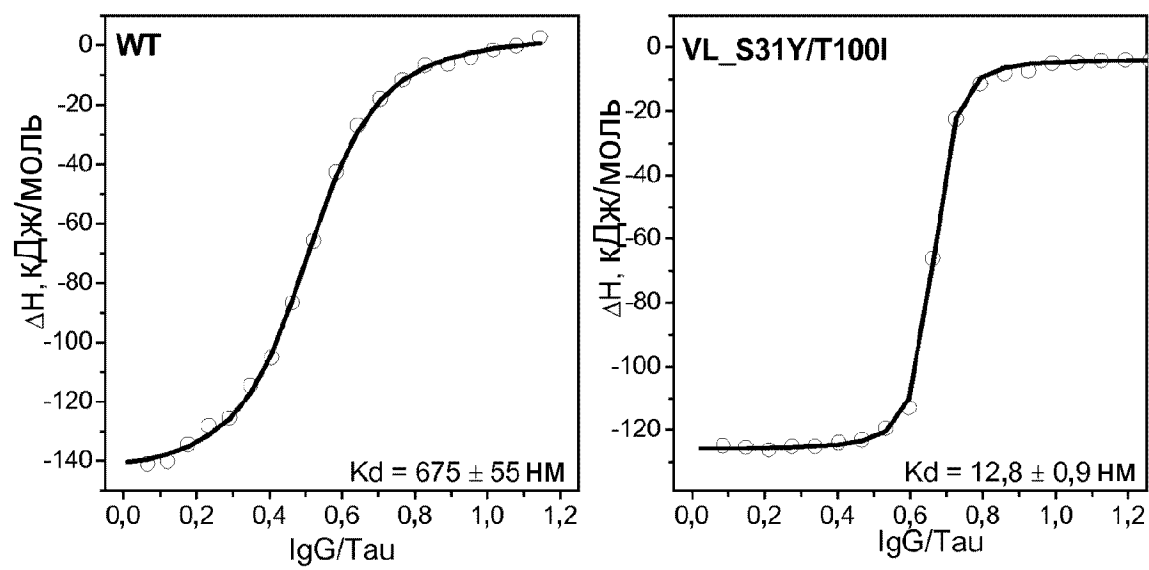
8. Иммуноконъюгат, содержащий по меньшей мере одну связывающую молекулу по любому из пп. 1-7 и дополнительно содержащий по меньшей мере одну метку.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по любому из пп. 1-7.

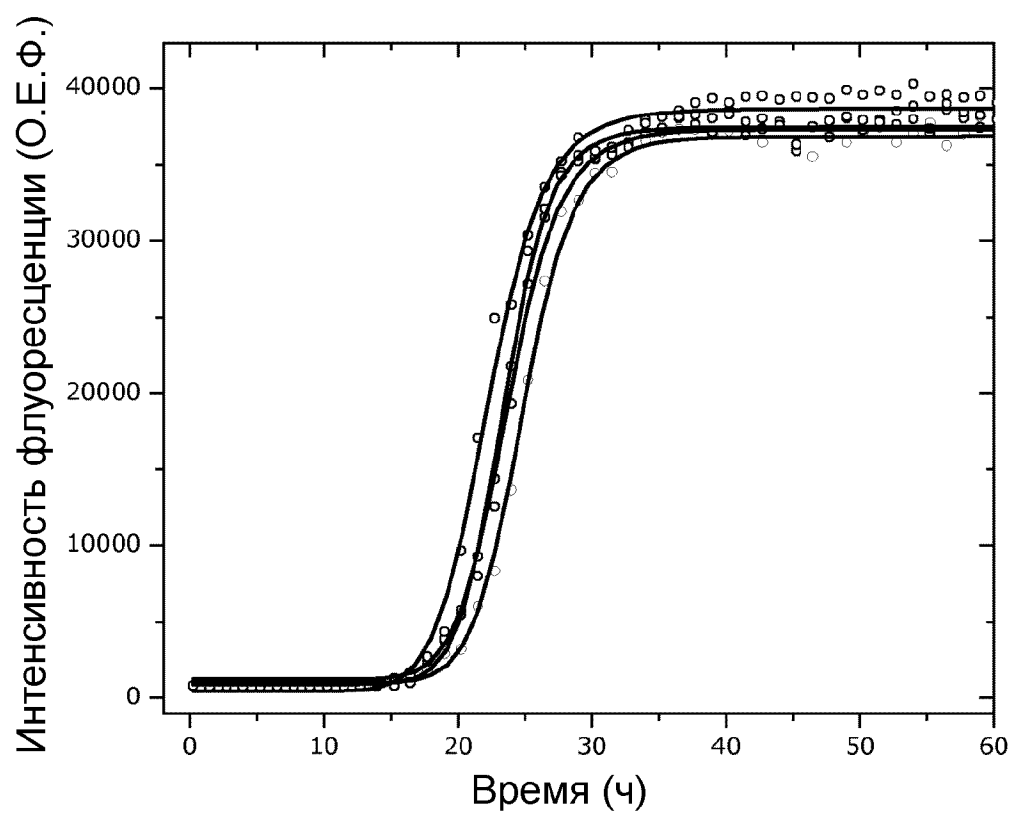
10. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.9.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по любому из пп. 1-7 и/или иммуноконъюгат по п.8 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

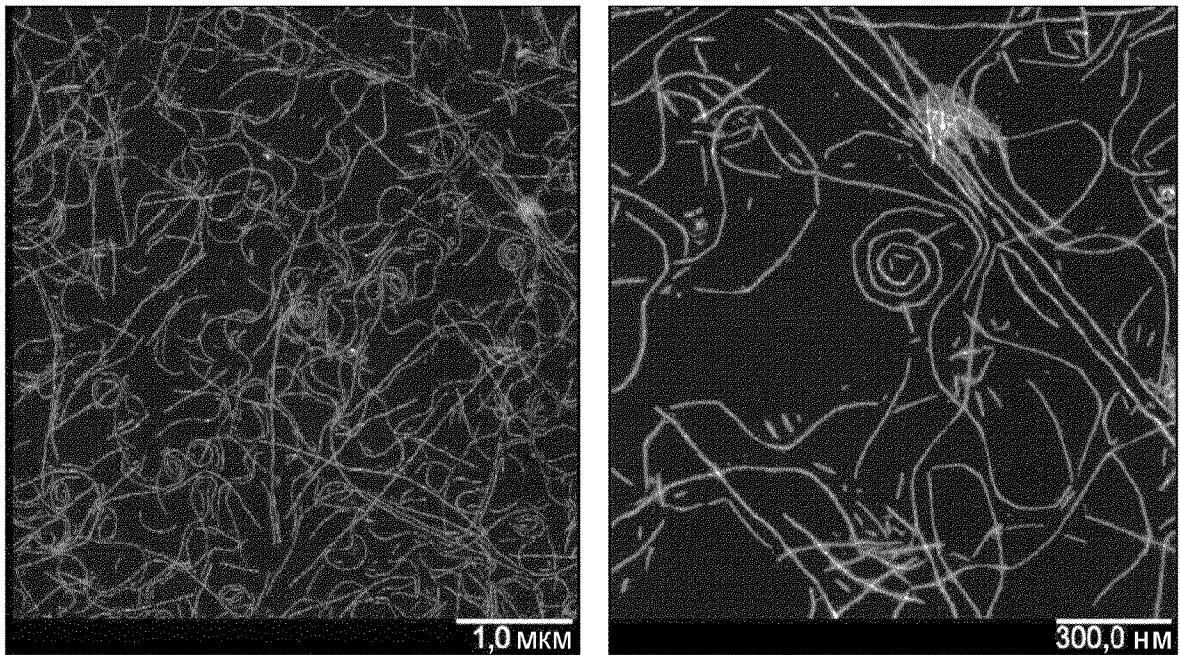
По доверенности



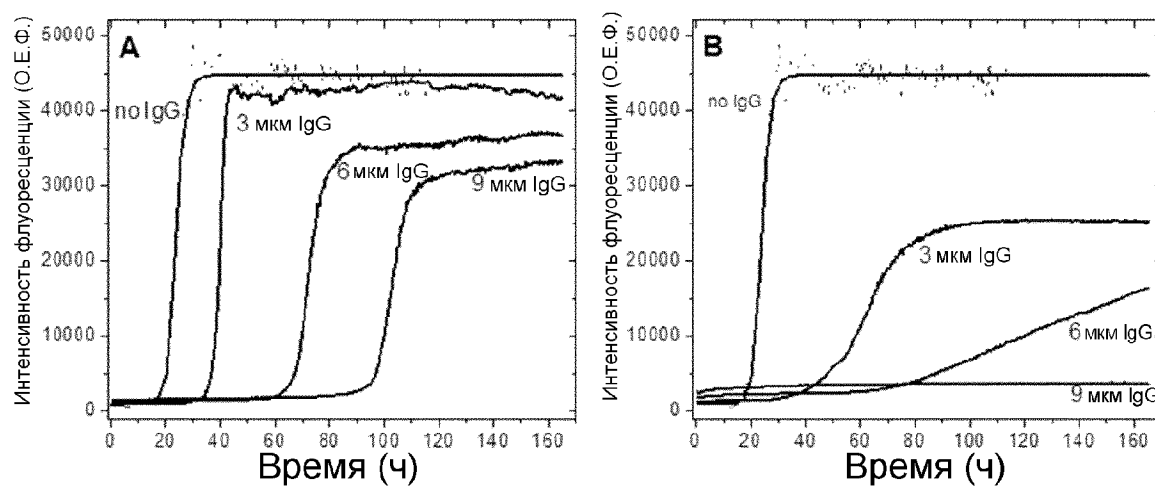
Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4