

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091350 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.02

(22) Дата подачи заявки
2018.12.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

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

(31) 17205124.5

(32) 2017.12.04

(33) EP

(86) PCT/EP2018/083451

(87) WO 2019/110571 2019.06.13

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

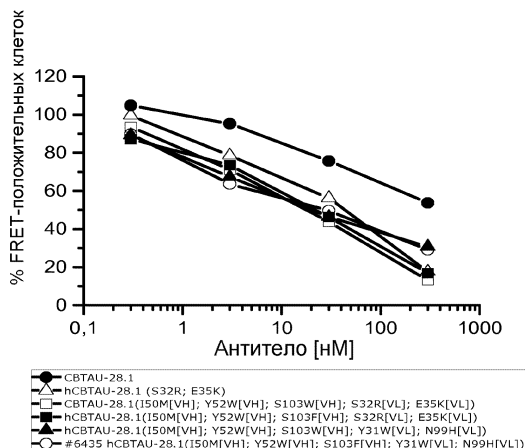
(72) Изобретатель:

Апетри Константин Адриан, Юрашек
Ярослав, Вервен Хармке Корнелия,
Янсон Росмарейн, Сирегар Бердин
Бюнга (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.



A1

202091350

202091350

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563193RU/019

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 распространение обсеменения тау-белком. Настоящее изобретение также относится к диагностическим, профилактическим и терапевтическим способам, в которых применяются связывающие тау-белок молекулы.

Предпосылки 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 еще быстрее, чем распространенность заболевания, особенно в развивающихся странах, поскольку появляется больше официальных систем социальной защиты, и рост доходов приводит к повышению альтернативных издержек.

В головном мозге пациентов с AD в больших количествах присутствуют две аномальные структуры: амилоидные бляшки и внутриклеточные нейрофибриллярные клубки (NFT или НФК). 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 растет параллельно с продолжительностью и тяжестью заболевания; было также показано, что нейрофибриллярная нагрузка коррелирует с когнитивными нарушениями.

Нейрофибриллярные клубки являются интранейрональными патологическими включениями, которые состоят из гиперфосфорилированных и нерастворимых скоплений тау-белка, ассоциированного с образованием микротрубочек. Эти скопления являются гистопатологическим признаком не только AD, но и многих других нейродегенеративных заболеваний, которые в совокупности известны под названием таупатии. Таупатии включают, например, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Пика (PiD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и лобно-височную

лобарную дегенерацию (FTLD). При тауопатиях у человека патология прогрессирует из одной области мозга в другую по специфической для заболевания клинической картине, основной механизм которой еще не ясен.

Нарушения, связанные с тау-белком, ассоциируются со многими таупатиями и могут быть их причиной. В своем нормальном состоянии тау-белок представляет собой хорошо растворимый белок, ассоциированный с микротрубочками, который экспрессируется преимущественно в нейрональных аксонах и связывает и способствует сборке и стабильности микротрубочек. Тау-белок содержит много потенциальных сайтов фосфорилирования, и было показано, что регулируемое фосфорилирование и дефосфорилирование некоторых из этих сайтов влияет на его взаимодействие с тубулином и функцией цитоскелета. Считается, что гиперфосфорилирование тау-белка приводит к диссоциации микротрубочек и к сборке обычно разупорядоченного, хорошо растворимого белка в β -листовые фибриллы или скопления тау-белка, также называемые парными спиральными филаментами (PHF), которые образуют NFT, и которые можно видеть при дистрофических нейритах и в клеточных телах. Несмотря на то, что начальная стадия фибриллизации тау-белка энергетически затруднена, после образования ядер они быстро привлекают к себе мономер тау-белка и превращаются в термодинамически стабильные агрегаты. Впоследствии эти агрегаты могут подвергаться фрагментации с образованием большего числа фибрилльных концов, которые способны привлекать к себе мономеры тау-белка и превращать их в новые фибриллы. Общим термином для обозначения такого процесса является «обсеменение». Количество патологического тау-белка коррелирует с прогрессирующей нейрональной дисфункцией, потерей синапсов и функциональными нарушениями у человека и в моделях на трансгенных мышах. Пассивную и активную иммунизацию против тау-белка анализировали на мышах с использованием нескольких разных мышинных моделей, включая различные фосфо-тау-пептиды для активной иммунизации и антитела к тау-белку для пассивной иммунотерапии. 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 влииваться, 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

Настоящее изобретение относится к новым связывающим молекулам, в частности к человеческим связывающим молекулам, например человеческим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые способны специфически связываться с мономерами тау-белка и парными спиральными филаментами (PHF), и которые способны подавлять распространение скапливания тау-белка и/или способствуют поглощению и разрушению скоплений тау-белка микроглией.

В предпочтительном варианте осуществления связывающие молекулы согласно настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из:

связывающей молекулы, содержащей 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: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны связывать мономеры тау-белка *in vitro*.

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

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны связывать парные спиральные филаменты (PHF) тау-белка и способствовать их поглощению микроглией *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы содержат переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16 и 17, и переменный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 18.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы согласно настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из:

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный

участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

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

В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы представляют собой человеческие моноклональные антитела IgG, предпочтительно антитела IgG1.

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: Оценка аффинности с помощью биослойной интерферометрии (Octet).

ФИГ. 2: Измерение сродства (аффинности) с помощью изотермической титрационной калориметрии.

ФИГ. 3: СВТАУ-28.1, но не СВТАУ-27.1, усиливает поглощение скоплений тау-белка клетками BV2.

ФИГ. 4: Способность антител СВТАУ-28.1 истощать очаги обсеменения из гомогенатов мозга AD.

Определения

Применяемое в данном контексте выражение “связывающая молекула” включает все известные из уровня техники классы и подклассы иммуноглобулина. В зависимости от

аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, связывающие молекулы можно разделить на пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

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 или 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*, под редакцией: E. Harlow and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, которое включено в данный документ ссылкой. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может 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 T-клеточных рецепторов. Международная база данных по иммуногенетике (The International ImMunoGeneTics database) (IMGT) ([http://www imgt_org](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 контексте 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. Прямой контакт между эпитопом и остатками паратопа устанавливается с помощью электростатических сил, таких как водородные связи, солевые мостики, сил Ван-дер-Ваальса на гидрофобных поверхностях и комплементарность форм. На границе взаимодействия также содержатся связанные молекулы воды или другие совместно действующие факторы, которые способствуют специфичности и сродству взаимодействий антиген-антитело. Энергия связывания комплекса антиген-антитело в основном обеспечивается небольшим набором контактных остатков на границе взаимодействия эпитоп-паратоп. Данные "остатки, важные с точки зрения энергии связывания" часто находятся в центре границы взаимодействия эпитопа-паратопа и составляют функциональный эпитоп. Контактные остатки на периферии границы 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 получение связывания 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" или "сродство" относится к степени силы связывания отдельного эпитопа или части 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 со сродством отдельных молекул иммуноглобулина в популяции к специфичным эпитопам, 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. Сродство 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), Kubly, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способов, описанных в данном документе. Общие методики измерения сродства антитела к антигену включают ELISA, RIA и поверхностный плазмонный резонанс. Измеренное сродство при определенном взаимодействии антитело-антиген может варьироваться при измерении в разных условиях, например, концентрации солей, pH. Таким образом, измерения сродства и других антигенсвязывающих параметров, например, KD, IC50, предпочтительно проводят со стандартными растворами антитела и антигена и стандартным буфером.

Термин "полинуклеотид" предназначен охватывать как единичную нуклеиновую кислоту, так и множества нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например, информационной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую как обнаруженная в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНА)). 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 природной 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 терминации 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 профилактическим 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 имеется 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 распространение скапливания тау-белка и/или способствуют поглощению и разрушению скоплений тау-белка микроглией, где связывающие молекулы выбирают из группы, состоящей из:

связывающей молекулы, содержащей 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: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

12; и

связывающей молекулы, содержащей CDR1 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR1 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны связывать мономеры тау-белка *in vitro*.

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

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны связывать парные спиральные филаменты (PHF) тау-белка и способствовать их поглощению микроглией *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16 и 17, и переменный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 18.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы согласно настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из:

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы представляют собой человеческие моноклональные антитела IgG, предпочтительно антитела IgG1.

Согласно настоящему изобретению предложены новые связывающие молекулы,

которые специфично связывают тау-белок с высоким сродством, и которые способны подавлять распространение PHF-подобных скоплений. В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы способны связывать PHF тау-белка и стимулировать их поглощение микроглией путем Fc-опосредованного механизма.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы связывают тау-белок со сродством, составляющим 250 нМ или меньше, предпочтительно - 100 нМ или меньше.

Тау-белок - это белок, который часто встречается в центральной и периферической нервных системах и имеет множество хорошо известных изоформ. В центральной нервной системе (ЦНС) человека по причине альтернативного сплайсинга существуют шесть основных изоформ тау-белка, размер которых варьируются от 352 до 441 (Hanger, et al. Trends Mol Med 15:112-9, 2009). Эти изоформы отличаются одна от другой по подвергающемуся регуляции включению 0, 1 или 2 N-концевых кислотных вставок (0N, 1N или 2N) и 3 или 4 tandemно расположенных повторов (3R или 4R), связывающихся с микротрубочками; здесь 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: 20 или под SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты данного изобретения специфично связываются с участком N-концевой вставки тау-белка.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты специфично связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 42-103 тау-белка.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты специфично связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки 52-71 тау-белка.

В определенных вариантах осуществления тау-белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Тау-белок связывает микротрубочки и регулирует перенос веществ в клетках - процесс, который можно изменять путем фосфорилирования тау-белка, что можно наблюдать во 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. Скопления тау-белка, таким образом, можно наблюдать в качестве главного компонента нейрофибриллярных клубков (NFT), например, при болезни Альцгеймера (AD), лобно-височных деменциях, надъядерном параличе, болезни Пика, заболеваниях, характеризующихся появлением аргирофильных зерен (AGD), кортикобазальной дегенерации, FTDP-17, болезни Паркинсона, деменции боксеров (обзор в Gendron and Petrucelli, *Mol. Neurodegener.* 4:13 (2009)).

Термин "нейрофибриллярный клубок" (NFT) относится к патологическим структурам, впервые описанным Альцгеймером в головном мозге пациента с деменцией. NFT состоит из упорядоченно расположенных парных спиральных филаментов гиперфосфорилированного тау-белка, 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.

Согласно изобретению предлагаются новые связывающие молекулы, которые специфично связываются с тау-белком и способны подавлять распространение скоплений тау-белка и/или способствовать их поглощению и возможному разрушению микроглией. Так, связывающие молекулы данного изобретения могут служить в качестве возможных терапевтических реагентов, предотвращающих образование таупатии, в качестве биомаркеров для оценки рисков развития AD и/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, вариабельные участки тяжелых и легких цепей, Fab, F(ab'), F(ab')₂, F_v, dAb, Fd фрагменты, фрагменты, представляющие собой определяющие комплементарность 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 специфического 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. Выявляемые фрагменты/средства включают, но без ограничений, ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминисцентные материалы, биолюминисцентные материалы, радиоактивные материалы, позитрон-активные металлы 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 регулируемыми экспрессию молекулами нуклеиновых кислот. Выбор вектора зависит от соблюдаемых процедур рекомбинации и используемого хозяина. Введение векторов в клетки-хозяева можно выполнять 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-ТК), 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 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 ВНК, 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 immortalizированы 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 Scicell 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" или "в сочетании" 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 распространения скапливания 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 патологическое 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 на терапевтическое средство со стороны антител или активированных Т-клеток или В-клеток с течением времени. Если уровень ответа понижается, назначается введение бустерной дозы.

При применении в профилактических целях фармацевтические композиции или лекарственные препараты вводятся пациенту, предрасположенному к АД 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 АД антитела по настоящему изобретению можно вводить в комбинации со средствами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида (Аβ). Возможно, что патологии с РНФ-тау-белком и Аβ являются синергичными. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на устранение патологий, связанных как с РНФ-тау-белком, так и с Аβ 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 дней 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 мг, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг 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 мг до приблизительно 30 мг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг 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, взятом у субъекта (например, в крови, моче, спинномозговой жидкости), посредством приведения в контакт биологического образца с серодиагностическим реактивом и обнаружения связывания серодиагностического реагента с PHF тау-белка в образце, взятом у 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 специфично связывается с первичным антителом. В диагностический набор, пригодный для измерения уровня тау-белка в биологическом образце, можно включать антитела, 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: 19) - 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 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 500 Ед 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 анализу SEC-MALS.

ПРИМЕР 2

Получение вариантов CBTAU-28.1

Ранее было идентифицировано антитело CBTAU-28.1 (как описано в WO 2015/197823).

Согласно настоящему изобретению новые и улучшенные варианты были сделаны с использованием рационального, основанного на структуре подхода и/или стратегий случайного мутагенеза.

Антитела IgG1 человека конструировали путем клонирования переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей в один вектор экспрессии, содержащий константные участки IgG дикого типа. Плазмиды, кодирующие последовательности, соответствующие человеческим антителам mAb к тау-белку, временно трансфицировали в клетки Expi293FTM, полученные из эмбриональной почки человека 293 (Thermo Fisher); через 7 дней после трансфекции экспрессированные антитела очищали из культуральной среды с помощью аффинной хроматографией MabSelect SuRe (GE Healthcare) с белком A. IgG элюировали из колонки 100 mM натрий-цитратным буфером, pH 3,5, который немедленно заменяли буфером в PBS, pH 7,4 с использованием самоупакованной колонки с Sephadex G-25 (GE Healthcare). Качество каждого антитела контролировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) и их реакционную способность к родственному тау-

пептиду дополнительно подтверждали с помощью биослойной интерферометрии Octet.

ПРИМЕР 3

Профили ассоциации и диссоциации, полученные с помощью биослойной интерферометрии Octet для CBTAU-28.1 дикого типа (WT) и вариантов CBTAU-28.1 с соответствующим ему родственным тау-пептидом A6940 (SEQ ID NO: 20).

Аминокислотная последовательность тау-пептида A6940 представляет собой:

$_{42}$ GLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA $_{103}$ (SEQ ID NO: 20). Пептид был связан через биотин со стрептавидиновым биосенсором. За ассоциацией (0-600 сек) наблюдали при погружении сенсора в раствор, содержащий варианты CBTAU-28.1 (100 нМ), тогда как за диссоциацией (600-1200 сек) наблюдали, перемещая сенсор, содержащий белковый комплекс, в буфер для кинетического анализа. Используемый для этих экспериментов буфер получали 10-кратным разведением буфера 10X «Pall ForteBio's Kinetics Buffer» в PBS. Улучшение сродства подтверждается большей величиной сдвига длины волны (нм) и/или более медленной кинетикой диссоциации.

Результаты показаны на Фигуре 1. Очевидно, что новые связывающие молекулы данного изобретения показали улучшенный профиль связывания с тау-пептидом (SEQ ID NO: 20). Это проявилось в более значительных сдвигах длин волн при ассоциации, которые указывают на то, что более высокая доля молекул антител связана с тау-пептидом в стационарных условиях, а более медленная кинетика диссоциации указывает на то, что новые связывающие молекулы остаются связанными с тау-пептидом в течение более длительного периода времени.

ПРИМЕР 4

Измерение сродства (аффинности) с помощью изотермической титрационной калориметрии (ITC)

Сродство новых антител определяли с использованием изотермического титрующего калориметра Microcal Auto-iTC200 (Malvern). Варианты тау-белка и CBTAU-28.1 подвергали диализу в PBS, pH 7,4, чтобы обеспечить идеальные условия совпадения по буферу. Тау-белок (пептид) при 20 мкМ немедленно титровали, используя исходный стандартный раствор CBTAU-28.1 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).

Тау-пептид A6940 (SEQ ID NO: 20), охватывающий остатки 42-103, титровали вариантами CBTAU-28.1 дикого типа (левый рисунок) или оптимизированными по сродству S32R [VL], E35K [VL] (правый рисунок) вариантами CBTAU-28.1. Результаты показаны на Фигуре 2. Изменения энтальпии при каждом впрыске показаны как функция молярного отношения IgG/тау-белок (•). Непрерывные линии представляют собой сглаживание данных в соответствии с моделью "одного множества связывающих сайтов". Равновесные константы диссоциации (K_d), полученные в результате сглаживания,

показаны в правых нижних углах каждого рисунка. Сродства других вариантов с улучшенным сродством (не показаны) по оценкам ИТС:

CBTAU-28.1 (I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];S32R[VL];E35K[VL]) : 67 ± 11 нМ

CBTAU-28.1 (I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];S32R[VL];E35K[VL]) : 63 ± 12 нМ

CBTAU-28.1 (I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];Y31W[VL];N99H[VL]) : 57 ± 7 нМ

CBTAU-28.1 (I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];Y31W[VL];N99H[VL]) : 45 ± 5 нМ

Измерения ИТС показывают, что новые связывающие молекулы связывают тау-белок с очень высоким сродством, что означает, что в определенный момент времени может быть обнаружена большая популяция молекул антител в комплексе с тау-белком.

ПРИМЕР 5

Содействие поглощению скоплений тау-белка микроглия

Введение метки в скопления рекомбинантного тау-белка

В агрегированный рекомбинантный тау-белок 2N4R (rTau) (SEQ ID NO: 19) ковалентно вводили метку pHrodo® Green STP Ester (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, агрегаты rTau центрифугировали при относительной центробежной силе (rcf) 20800 в течение 30 минут и затем повторно суспендировали в 0,1 М бикарбонатном натриевом буфере с pH 8,5, при конечной концентрации 2 мг/мл. Десять молей красителя добавляли на моль белка и смесь инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Неконъюгированный краситель удаляли с использованием колонки PD10 (GE Healthcare), уравновешенной 0,1 М бикарбонатным натриевым буфером с pH 8,5. Меченые агрегаты rtau оценивали на содержание белка с помощью анализа BCA (Thermo Scientific), следуя инструкциям производителя.

Анализ поглощения рекомбинантного тау-белка (rTau)

Клетки BV-2 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамина. Культуры выдерживали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C.

Для создания иммунокомплексов 250 нМ агрегированного rTau, ковалентно меченного красителем pHrodo Green, инкубировали при серийном разведении (6-150 нМ) с использованием CBTAU-28.1 (дикого типа и новых связывающих молекул данного изобретения) или CBTAU-27.1 (как описано в WO2015/197823) и мутанта S27_dY;T100I (как описано в одновременно рассматриваемой заявке EP17163425.6) в бессывороточной среде. Иммунокомплексы Тау также получали с 300 нМ Fab-фрагментами как CBTAU-28.1, так и CBTAU-27.1, в формате дикого типа и мутанта с высоким сродством. В каждый эксперимент включали контрольный мышинный изотип IgG1 вместе с клетками, инкубированными только с агрегированным rTau.

Иммунокомплексы инкубировали в течение ночи при 4°C и на следующий день применяли к клеткам BV2 в течение 2 часов при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования клетки собирали, используя 0,25% трипсин-EDTA в течение 20 минут, таким образом, одновременно удаляя тау-белок, связанный с внеклеточной мембраной, центрифугировали

при относительной центробежной силе (rcf) 400 для удаления удаляемой среды, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в буфере для проточной цитометрии (PBS 1x плюс 0,5% BSA и 2 mM EDTA). Клетки анализировали с помощью проточного цитометра Canto II (BD) с установкой дискриминационного окна для популяции живых одиночных клеток согласно определению по профилям прямого и бокового рассеяния. Каждый эксперимент проводили в двух повторностях.

Как показано на Фигуре 3, CBTAU-28.1 (A), но не CBTAU-27.1 (B), способствует поглощению гTau в клетках BV2. Поглощение происходило благодаря Fc, поскольку Fab-фрагменты CBTAU-28.1 не увеличивали поглощение тау-белка (данные не показаны).

Кривые титрования CBTAU-28.1 дикого типа (WT) и новых связывающих молекул данного изобретения ясно продемонстрировали, что антитела данного изобретения могут содействовать поглощению тау-белка в клетках BV2 в большей степени, чем антитело WT, что видно по более высокому уровню флуоресценции при определенной концентрации антител (A). Кривые титрования CBTAU-27.1 дополнительно подтверждают отсутствие какого-либо влияния этого антитела на поглощение тау-белка (B). Наблюдается увеличение MFI в несколько раз по сравнению с одними только клетками BV2.

Результаты показывают, что новые связывающие молекулы данного изобретения могут связываться со скоплениями тау-белка и что комплексы могут поглощаться микроглией посредством Fc-опосредованного механизма дозозависимым образом. Эффективность поглощения намного выше в случае новых связывающих молекул. С другой стороны, варианты CBTAU-27.1 не способны связывать скопления тау-белка и, следовательно, не могут содействовать поглощению PHF микроглией.

ПРИМЕР 6

Способность антител CBTAU-28.1 истощать очаги обсеменения из гомогенатов мозга AD.

Гомогенаты, содержащие очаги обсеменения тау-белком, получали из криоконсервированной ткани человеческого головного мозга с AD. В анализах иммунодеплеции очаги обсеменения инкубировали с аналитическим антителом и удаляли из раствора с белковыми шариками G Dynabeads. Обедненную надосадочную жидкость (названная «иммуноистощенной фракцией») исследовали на остаточную способность к обсеменению в клетках HEK293, содержащих хромофор-K18, и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Биосенсорные клетки FRET представляют собой клетки HEK, стабильно экспрессирующие K1 P301S-CFP и K18/P301S-YFP, которые высевали в 96-луночный планшет. Иммуноистощенные фракции трансфицировали в клетках путем предварительного смешивания фракций с Lipofectamine 2000 для увеличения пределов анализа и инкубировали на реципиентных биосенсорных клетках FRET в течение 2 дней, после чего клетки трипсинизировали, и процент FRET-положительных клеток определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Сигнал FRET можно измерить только

тогда, когда репортерные белки K18 образуют агрегаты и, следовательно, CFP и YFP находятся в непосредственной близости. При возбуждении CFP энергия передается на YFP, что приводит к флуоресцентному излучению YFP (Holmes et al, 2014, PNAS 111, E4376-E4385)

Очаги обсеменения:

Криоконсервированную ткань головного мозга получали из биобанка (Newcastle Brain Tissue Resource). Замороженную мозговую ткань гомогенизировали с помощью гомогенизатора Dounce при 1000 об/мин в течение 10 запусков в буфере для гомогенизации (10 mM Tris (Gibco, кат. № 15567-027), 150 mM NaCl (Gibco, кат. № 24740-011), pH 7,4, фильтр: 0,22 мкм+Полные мини-ингибиторы протеазы, не содержащие ЭДТА (Complete mini EDTA-free protease inhibitors, Roche, кат. № 11 836 170 001)), чтобы получить 10% мас./об. гомогената. Гомогенат центрифугировали при $27000 \times g$, 10 минут при 4°C и надосадочную жидкость хранили в аликвотах при -80°C до тех пор, пока их не использовали в качестве очагов обсеменения в анализе на иммуноистощение.

Процедура анализа:

Разведения 660 нМ антител готовили в PBS (Sigma, кат. № D8537) для получения конечной концентрации 300 нМ в смеси антитело-очаг обсеменения-шарик, описанной ниже. Очаги обсеменения разводили в 1,3 раза в PBS для достижения полного истощения при концентрации антитела 300 нМ и поддержания приемлемого периода обсеменения. Разведения антител и очагов обсеменения смешивали в соотношении 1:1 в 96-луночном планшете для ПЦР (Thermo Scientific AB-0600) и инкубировали до промывания шариков.

121,5 мкл суспензии Protein-G DynaBeads (Life Technologies; кат. № 10004D) вносили в каждую лунку 96-луночного планшета для ПЦР (Thermo Scientific AB-0600) и дважды промывали, притягивая шарики вниз с помощью магнита (Life Technologies; кат. № 123.31D), чтобы иметь возможность удалить буфер из шариков и повторно суспендировать шарики в PBS с 0,01% Tween20 (Sigma, кат. № P1379). Промывочный буфер полностью удаляли и 10 мкл PBS с 0,1% Tween 20 добавляли к шарикам в каждой лунке и в каждую лунку вносили 90 мкл смеси 1:1 антитело-очаг обсеменения. Смесь антитело-очаг обсеменения-шарик должна содержать 0,01% Tween20 для предотвращения прилипания шариков к пластику планшета для ПЦР.

Смесь антитело-очаг обсеменения-шарик инкубировали в течение ночи при 4°C, вращая со скоростью 5 об/мин. На следующий день конденсат удаляли с крышки центрифугированием при 3000 об/мин в течение примерно 20 секунд. Иммуноистощенные фракции отделяли от шариков путем притягивания шариков с помощью магнита и переносили на новый 96-луночный планшет для ПЦР для хранения при -80°C до испытания на биосенсорных клетках FRET на предмет оставшейся способности к обсеменению. Шарики дважды промывали, как описано выше, и хранили в сухом виде в планшете для ПЦР при -20°C. Каждое условие проверяли в двух повторностях.

Иммуноистощенные фракции обратно трансфицировали в биосенсорные клетки FRET: 10 мкл иммуноистощенной фракции добавляли в каждую лунку 96-луночного

планшета (µclear планшеты с покрытием из поли-D-лизина; Greiner Bio-one, кат. № 655946). Добавляли 10 мкл Lipofectamine 2000 (Invitrogen, кат. № 11668-027), разведенного в 40 раз в Opti-MEM (Gibco, кат. № 11058-021), и эту смесь инкубировали в течение 10 минут в планшете. В каждую лунку вносили 55 000 биосенсорных клеток FRET в 130 мкл DMEM, с высоким содержанием глюкозы, добавку GlutaMAX™, пируват (Gibco, кат. № 31966-021) с добавлением 10% (об./об.) инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (Biowest, кат. № S1810-500) и 1% Penstrep (Sigma P4333). После двух дней инкубирования при 37°C клетки дважды промывали PBS (Sigma, кат. № D8537), а затем отделяли в течение 5 минут при 37°C с 50 мкл/лунку 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, кат. № 25300-054). Клетки повторно суспендировали многократным пипетированием вверх и вниз и визуально проверяли на наличие единичных клеток с помощью микроскопа. 30 мкл/лунку буфера FACS (сбалансированный солевой раствор Хэнка (Sigma, кат. № H8264), 1 mM EDTA (Invitrogen, кат. № 15575-038), 1% FBS (Biowest, кат. № S1810-500)) добавляли в полипропиленовый круглодонный планшет (MW384; Costar, кат. № 3657), в который вносили 50 мкл клеточной суспензии. Клетки анализировали на положительный ответ по FRET с помощью проточной цитометрии.

Как показано на Фигуре 4, CBTAU-28.1 способен истощать PHF из мозга с AD дозозависимым образом, что отражается в снижении эффективности обсеменения до примерно 60% для самой высокой концентрации антител, используемых в этом эксперименте. Кроме того, молекулы CBTAU-28.1 с улучшенным сродством демонстрируют значительно более высокую эффективность истощения PHF. Это видно по более сильной зависимости эффекта от дозы, а также по тому, что при самой высокой концентрации антител, использованной в эксперименте, эффективность обсеменения падает до 10-30% от первоначальной. Эти наблюдения показывают, что эти антитела обладают повышенной способностью нейтрализовать очаги обсеменения PHF из мозга с AD при более высоких концентрациях.

Последовательности:

CBTAU-28.1	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
HC_дикого типа	GYSFTNYW (1)	IYPGDSDT (2)	ARVGRPSKGGWF DP (3)
LC_дикого типа	QTLlySSNEKNY (4)	WAS (5)	QQYYNSPYT (6)
S32R[VL];E35K[VL]_HC	GYSFTNYW (1)	IYPGDSDT (2)	ARVGRPSKGGWF DP (3)
S32R[VL];E35K[VL]_LC	QTLlyRSN K KNY (7)	WAS (5)	QQYYNSPYT (6)
I50M[VH];Y52W[VH];S103	GYSFTNYW (1)	IWPGDSDT	ARVGRP W KGGWF

W[VH];S32R[VL];E35K[VL] _HC		(8)	DP (9)
I50M[VH];Y52W[VH];S103 W[VH];S32R[VL];E35K[VL] _LC	QTLlyRSN K KNY (7)	WAS (5)	QQYYNSPYT (6)
I50M[VH];Y52W[VH];S103F [VH];S32R[VL];E35K[VL] _HC	GYSFTNYW (1)	IWPGDSDT (8)	ARVGRPF K GGWF DP (10)
I50M[VH];Y52W[VH];S103F [VH];S32R[VL];E35K[VL] LC	QTLlyRSN K KNY (7)	WAS (5)	QQYYNSPYT (6)
I50M[VH];Y52W[VH];S103 W[VH];Y31W[VL];N99H[V L]_HC	GYSFTNYW (1)	IWPGDSDT (8)	ARVGRPW K GGWF DP (9)
I50M[VH];Y52W[VH];S103 W[VH];Y31W[VL];N99H[V L]_LC	QTLWSSNEK N Y (11)	WAS (5)	QQYY H SPYT (12)
I50M[VH];Y52W[VH];S103F [VH];Y31W[VL];N99H[VL] _HC	GYSFTNYW (1)	IWPGDSDT (8)	ARVGRPF K GGWF DP (10)
I50M[VH];Y52W[VH];S103F [VH];Y31W[VL];N99H[VL] LC	QTLWSSNEK N Y (11)	WAS (5)	QQYY H SPYT (12)

Вариабельный участок тяжелой цепи WT CBTAU 28.1 (SEQ ID NO: 13):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
DSDTRYSPPFQGGVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYICARVGRPSKGGWFDPWG
QGTLVTVSS

Вариабельный участок легкой цепи WT TBTAU 28.1 (SEQ ID NO: 14):

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLlySSNEK**N**YLAWYQQKPGQPPKLLIS
WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTRLEIK

Вариабельный участок тяжелой цепи S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 13):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
DSDTRYSPPFQGGVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYICARVGRPSKGGWFDPWG
QGTLVTVSS

Вариабельный участок легкой цепи S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 15)

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLlyRSN**K**KNYLAWYQQKPGQPPKLLIS

WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTRLEIK

Вариабельный участок тяжелой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 16):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGMIW
PGDSDTRYSPPFQGQVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYYCARVGRPWKGGWFDP
WGQGTLLTVSS

Вариабельный участок легкой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 15):

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLLYRSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIS
WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTRLEIK

Вариабельный участок тяжелой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 17):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGMIW
PGDSDTRYSPPFQGQVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYYCARVGRPFKGGWFDP
WGQGTLLTVSS

Вариабельный участок легкой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];S32R[VL];E35K[VL] (SEQ ID NO: 15):

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLLYRSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIS
WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTRLEIK

Вариабельный участок тяжелой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];Y31W[VL];N99H[VL] (SEQ ID NO: 16):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGMIW
PGDSDTRYSPPFQGQVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYYCARVGRPWKGGWFDP
WGQGTLLTVSS

Вариабельный участок легкой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103W[VH];Y31W[VL];N99H[VL] (SEQ ID NO: 18):

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLLWSSNEKNYLAHYQQKPGQPPKLLIS
WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYHSPYTFGQGTRLEIK

Вариабельный участок тяжелой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];Y31W[VL];N99H[VL] (SEQ ID NO: 17):

QVQLQQSGAEVKKPGESLKISCEASGYSTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGMIW
PGDSDTRYSPPFQGQVTITADRSITTAYLEWSSLKASDTAMYYCARVGRPFKGGWFDP
WGQGTLLTVSS

Вариабельный участок легкой цепи

I50M[VH];Y52W[VH];S103F[VH];Y31W[VL];N99H[VL] (SEQ ID NO: 18):

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQTLLWSSNEKNYLAHYQQKPGQPPKLLIS
WASTPESGVPDRFSGSGSGTSFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYHSPYTFGQGTRLEIK

Тау-белок 2N4R (SEQ ID NO: 19):

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTP

SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANAT
 RIPAKTTPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRT
 PPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKC
 GSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
 VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL
 NVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSAASLAKQGL

Tau-пептид A6940 (SEQ ID NO: 20):

42-

GLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGT
 TA-103

Tau-пептид A7731 (SEQ ID NO: 21):

52-TEDGSEEPGSETSDAKSTPT-71

легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

2. Связывающая молекула согласно п. 1, где связывающая молекула содержит переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16 и 17, и переменный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 18.

3. Связывающая молекула согласно п.1 или п. 2, где связывающая молекула выбрана из группы, состоящей из:

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

связывающей молекулы, содержащей переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

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

5. Связывающая молекула согласно любому из пп. 1-4, где связывающая молекула представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

6. Связывающая молекула согласно любому из пп.1-5, предназначенная для подавления распространения скоплений тау-белка и/или способствующая поглощению и разрушению скоплений тау-белка микроглией.

7. Связывающая молекула согласно любому из пп. 1-5 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в диагностике, профилактике

и/или лечении нейродегенеративных заболеваний, при которых происходит патологическое скапливание тау-белка.

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

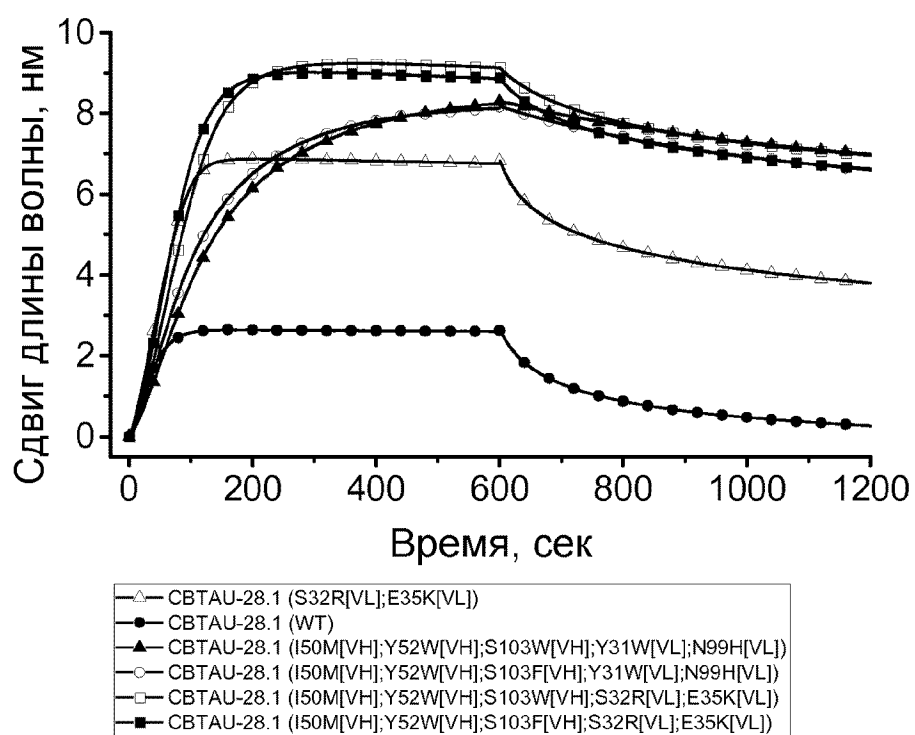
9. Иммуноконъюгат, содержащий по меньшей мере одну связывающую молекулу согласно любому одному из пп. 1-8 и дополнительно содержащий по меньшей мере одну метку.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по любому из пп. 1-8.

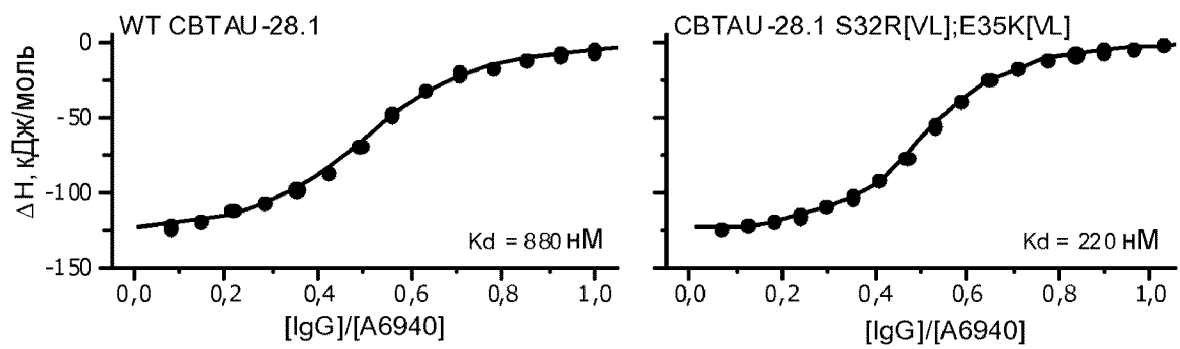
11. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно п. 10.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу согласно любому из пп. 1-8, и/или иммуноконъюгат согласно п. 9, и фармацевтически приемлемый носитель или формообразующее.

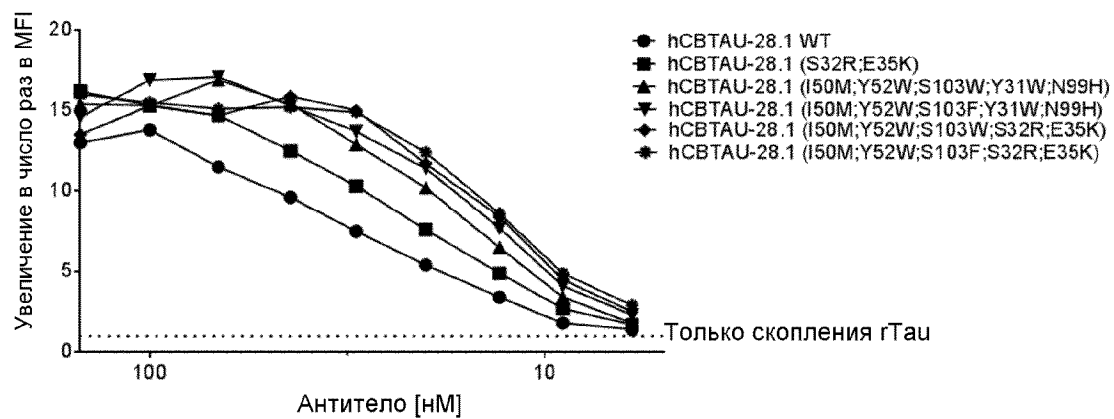
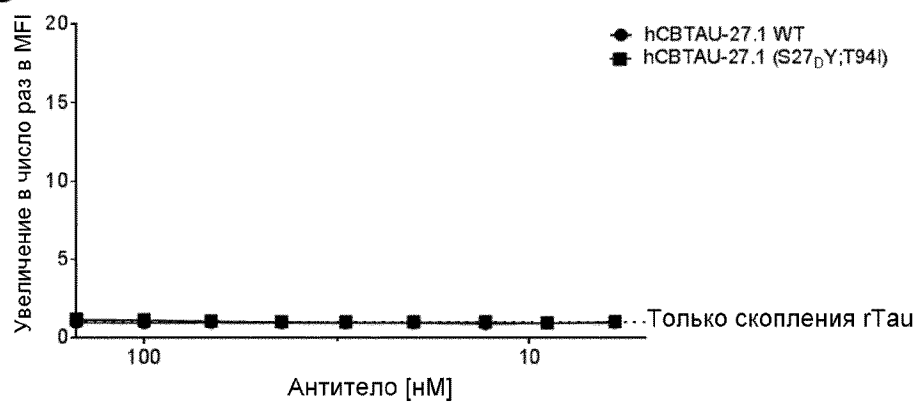
По доверенности



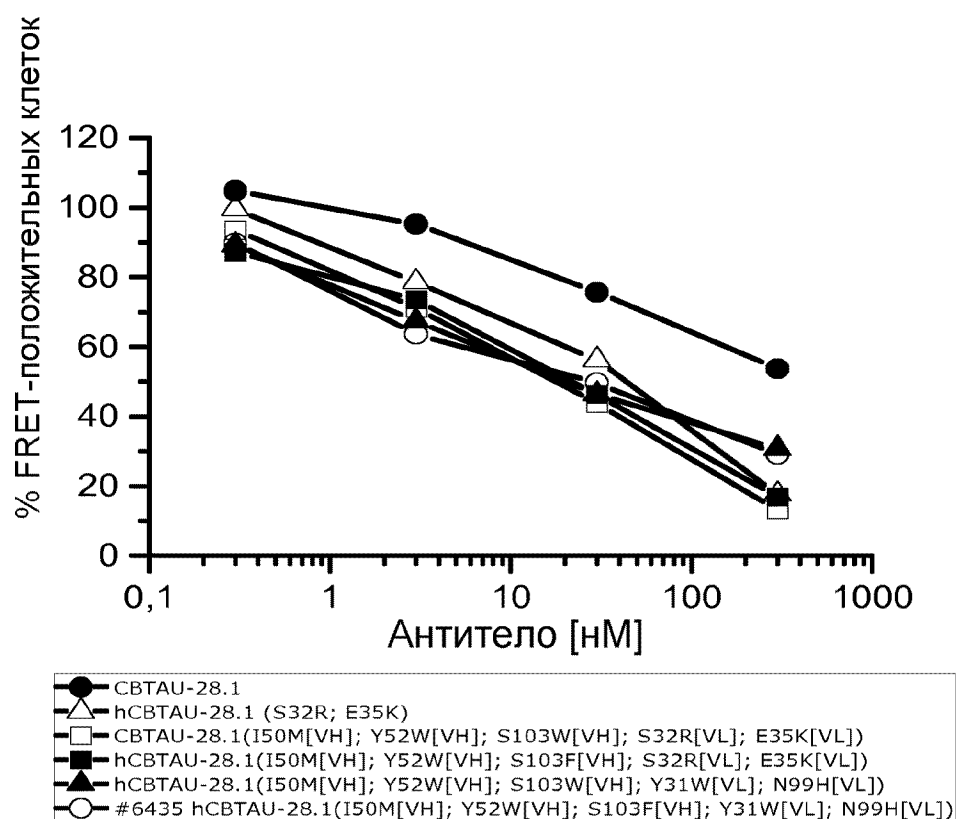
ФИГ. 1



ФИГ. 2

A**B**

ФИГ. 3



ФИГ. 4