

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092088 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.13

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.04

(54) АНТИТЕЛА АНТИ-RHF-TAU И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/638,535

(72) Изобретатель:

(32) 2018.03.05

Ван Колен Кристоф, Меркен Марк
(BE), Бароун Линда, Лейси Эйлин Р.,
Нэнджунда Рупеш, Уилер Джон, Ло
Цзиньцюань (US), Боргерс Марианн
(BE)

(33) US

(86) PCT/IB2019/051748

(87) WO 2019/171259 2019.09.12

(71) Заявитель:

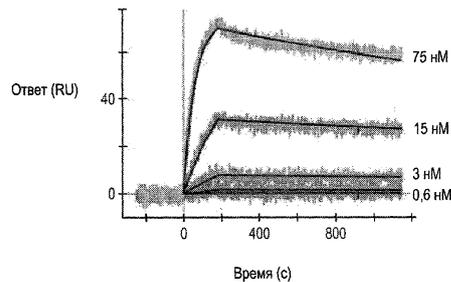
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(74) Представитель:

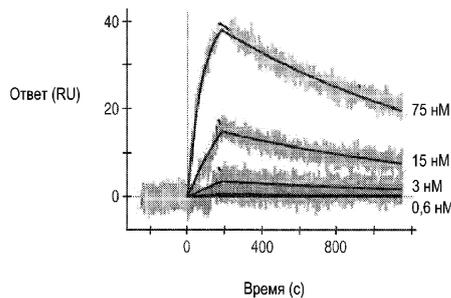
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны моноклональные антитела к тау-белку и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны кодирующие антитела нуклеиновые кислоты, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики таких патологических состояний, как таупатия. Антитела изобретения также можно применять для количественного определения тау-белка в биологических пробах.

A



B



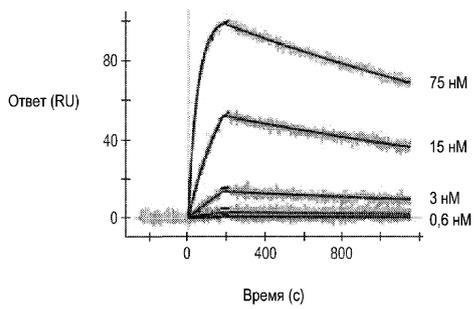
202092088

A1

A1

202092088

С



202092088

A1

A1

202092088

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564747EA/042

АНТИТЕЛА АНТИ-RHF-ТАУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам анти-RHF-тау, а также к способам их получения и применения.

Предпосылки создания изобретения

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. БА является очень частой причиной прогрессирующего умственного угасания (деменции) у пожилых людей и считается четвертой по частоте медицинской причиной смерти в США. БА наблюдается в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. У пациентов с БА обычно обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков из парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

Основным белковым компонентом нейрофибриллярной дегенерации при БА и ряде других нейродегенеративных заболеваний является избыточно фосфорилированная форма ассоциированного с микротрубочками тау-белка. Разработка терапевтических средств для профилактики или противодействия агрегированию тау-белка уже многие годы вызывает большой интерес, но потенциальные препараты, включая противодействующие агрегированию соединения и ингибиторы киназы, только лишь сейчас достигли стадии клинических испытаний (Brunden, et al. *Nat Rev Drug Discov* 8:783-93, 2009).

Недавно на трансгенных мышинных тау-моделях были получены доклинические данные, что активная и пассивная иммунизация к тау-белку может обладать терапевтическим потенциалом (Chai, et al. *J Biol Chem* 286:34457-67, 2011, Boutajangout, et al. *J Neurochem* 118:658-67, 2011, Boutajangout, et al. *J Neurosci* 30:16559-66, 2010, Asuni, et al. *J Neurosci* 27:9115-29, 2007). Недавно была описана гипотеза передачи и распространения таупатии, основанная на предложенных Брааком стадиях развития таупатии в мозге человека и распространения таупатии после инъекции тау-агрегатов в доклинических тау-моделях (Frost, et al. *J Biol Chem* 284:12845-52, 2009, Clavaguera, et al. *Nat Cell Biol* 11:909-13, 2009). Таким образом, существует потребность в терапевтических средствах для профилактики агрегирования тау-белка и развития таупатии для лечения БА и других нейродегенеративных заболеваний.

Изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте изобретение относится к выделенному антителу, предпочтительно к выделенному моноклональному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает PHF-тау, предпочтительно PHF-тау человека.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент имеет тяжелую цепь, содержащую HCDR1 с SEQ ID NO:1 или 7; HCDR2 с SEQ ID NO:2, 8, 10, 12, 13 или 14; и HCDR3 с SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения имеет легкую цепь, содержащую LCDR1 с SEQ ID NO:4, 9 или 11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6. В других вариантах осуществления моноклональное антитело изобретения содержит CDR, который совпадает по меньшей мере на 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с CDR по любой из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% совпадает с любой из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24. В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% совпадает с любой из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25.

В другом варианте осуществления выделенное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область, такую как константную область тяжелой цепи IgG человека или мыши, и константную область легкой цепи каппа или лямбда антитела человека или мыши.

В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент.

В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу снижения патологического агрегирования тау-белка или распространения таупатии у пациента, включающему введение пациенту фармацевтической композиции изобретения. Таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортикобазальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофической боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдрома Дауна, синдрома Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдрома Галлервордена - Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, не-Гуамовой болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и деменции боксеров.

[0001] Таупатия предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), FTDP-17 и прогрессирующий супрануклеарный парез зрения.

[0002] Наиболее предпочтительно таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера).

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения, включающему культивацию клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент, включающему объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу обнаружения присутствия РНФ-тау у пациента или способу диагностирования таупатии у пациента путем обнаружения присутствия РНФ-тау у пациента с применением антитела изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента.

Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из

представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

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

На **Фиг. 1А-1С** показано связывание mAb PT82, экспрессируемого рекомбинантным способом, или его Fab-фрагмента с РНФ-тау и растворимым тау-белком по результатам анализа с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR), причем концентрация антитела или Fab указана рядом с соответствующей сенсограммой (75 нМ; 15 нМ; 3 нМ; 0,6 нМ). Показано связывание **(А)** mAb с РНФ **(В)** Fab с РНФ и **(С)** Fab с 2N4R тау.

На **Фиг. 2** показано связывание PT82 из супернатанта гибридомы и PT82, экспрессируемого рекомбинантным способом, с рекомбинантным 2N4R тау по результатам ИФА с применением двух концентраций покрытия 2N4R тау, 10 нг/мл или 1 нг/мл.

На **Фиг. 3А-3В** показана способность mAb PT82 блокировать образование тау-агрегатов по результатам анализа методом Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). **(А)** - диаграмма анализа FRET в примененной клеточной модели. **(В)** - эффективность PT82 в анализе FRET по сравнению с mAb отрицательного контроля (антитело CNTO1037/C18A).

На **Фиг. 4А-4С** показана способность mAb PT82 блокировать образование тау-агрегатов по результатам анализа методом иммунодеплеции. **(А)** - диаграмма иммунодеплеции при применении mAb PT82 для проведения иммунодеплеции либо гомогенатов из мозга человека с БА, либо экстракта спинного мозга мыши P301S. Антитело mAb PT82 показало способность уменьшать зародыши тау-белка и в гомогенате из мозга человека с БА, и в экстракте спинного мозга мыши P301S по результатам **(В)** анализа методом FRET и **(С)** селективного к агрегированию тау-белка анализа на платформе Meso Scale Discovery (MSD).

На **Фиг. 5А-5В** показана эффективность PT82 в сравнении с эффективностью антител АТ180 и РТ3 в модели инъекции eРНФ *in vivo* при анализе **(А)** полного гомогената или **(В)** нерастворимой фракции.

На **Фиг. 6А-6D** показана эффективность PT82 и РТ3 при **(А)** периферийном введении (интраперитонеальной инъекции) антитела в сравнении с **(В)** совместной интракраниальной инъекции антитела и РНФ. Эффективность анализировали по **(С)** полным гомогенатам и по **(D)** нерастворимым фракциям.

На **Фиг. 7** показаны данные картирования эпитопов с применением линейного пептидного картирования РТ82.

На **Фиг. 8** показано связывание гуманизированного mAb РТ82 растворимым тау-

белком по результатам ИФА.

Подробное описание изобретения

При применении в настоящем документе термин «антитела» используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антител.

В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин «фрагменты антител» означает часть интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, CDR, антигенсвязывающие сайты, переменные области тяжелой или легкой цепи, диатела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, образованные из по меньшей мере двух интактных антител или их фрагментов.

Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из «каркасной» области, прерываемой «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов следующим образом: (i) Определяющие комплементарность области (CDR) основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat *J Exp Med* 132:211-50, 1970). По существу антигенсвязывающий сайт имеет три области CDR в каждой переменной области (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в переменной области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в переменной 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 «гиперпеременная область», HVR или HV относится к областям переменной домена антитела, которые гиперпеременны по структуре согласно определениям Chothia и Lesk (Chothia and Lesk *J Mol Biol* 196:901-17, 1987). По существу антигенсвязывающий сайт имеет по три гиперпеременные области в каждой из переменных областей тяжелой цепи VH (H1, H2, H3) и легкой цепи VL (L1, L2, L3). Chothia и Lesk называют структурно консервативные гиперпеременные области «каноническими структурами». Системы нумерации и аннотация областей CDR и HV были недавно пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and Martin *Mol Immunol* 45:3832-9, 2008). (iii) Другое определение областей, которые образуют антигенсвязывающий сайт, было предложено Lefranc (Lefranc, et al. *Dev Comp Immunol* 27:55-77, 2003) на основе сравнения доменов V из иммуноглобулинов и рецепторов T-

клеток. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) представлены стандартизированная нумерация и определение этих областей. Соответствие между разграничениями областей CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., см. выше. (iv) Антигенсвязывающий сайт также может быть выделен на основе применения определяющих специфичность остатков (SDRU) (Almagro J Mol Recognit 17:132-43, 2004), причем термин «определяющий специфичность остаток» (SDR) относится к тем аминокислотным остаткам иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном.

«Каркас» или «каркасная последовательность» это оставшиеся последовательности внутри вариабельной области антитела, отличные от последовательностей, отнесенных к последовательностям антигенсвязывающих сайтов. Поскольку конкретное определение антигенсвязывающего сайта может быть сформулировано на основе разных признаков, как описано выше, конкретная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

При применении в настоящем документе термин «моноклональное антитело» (mAb) означает антитело (или фрагмент антитела), полученное из популяции по существу однородных антител. Моноклональные антитела высокоспецифичны, обычно направлены против единственной антигенной детерминанты.

При применении в настоящем документе термин «эпитоп» означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот, фосфорилированных аминокислот или полисахаридов, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть по природе линейным или несмежным эпитопом, например конформационным эпитопом, который образован за счет взаимного пространственного расположения несмежных аминокислот антигена, а не за счет линейной последовательности аминокислот. Конформационные эпитопы включают в себя эпитопы, возникающие в результате сворачивания антигена, когда аминокислоты из различных частей линейной последовательности антигена оказываются рядом друг с другом в трехмерном пространстве.

Тау-белок широко представлен в центральной и периферической нервной системе и имеет множество хорошо известных изоформ. В ЦНС человека в результате альтернативного сплайсинга существует шесть основных изоформ тау-белка с диапазоном размеров от 352 до 441 (Hanger, et al. Trends Mol Med 15:112-9, 2009). Эти изоформы отличаются друг от друга регулируемым включением 0-2 N-концевых вставок и 3 или 4 тандемно организованных повторов связывания с микротрубочками и получили названия 0N3R (SEQ ID NO: 26), 1N3R (SEQ ID NO: 27), 2N3R (SEQ ID NO: 28), 0N4R (SEQ ID NO: 29), 1N4R (SEQ ID NO: 30) и 2N4R (SEQ ID NO: 31). Термины «контрольный тау-белок» и «растворимый тау-белок» в настоящем документе применяются в качестве

взаимозаменяемых и относятся к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 31, в которой отсутствуют фосфорилирование и иные посттрансляционные модификации.

Тау-белок связывается с микротрубочками и регулирует транспорт карго через клетки, процесс, который можно модулировать фосфорилированием тау-белка. В БА и связанных расстройствах аномальное фосфорилирование тау-белка является доминирующим и считается предшественником и/или инициатором агрегирования тау-белка в фибриллы, получившие название парных спиральных филаментов (PHF). Основным компонентом PHF является избыточно фосфорилированный тау-белок. При применении в настоящем документе термин «тау парных спиральных филаментов» или «PHF-тау» относится к хорошо известным тау-агрегатам в парных спиральных филаментах. В электронной микроскопии явно проявляются две основные области в структуре PHF: рыхлая оболочка и центральный филамент; при этом рыхлая оболочка чувствительна к протеолизу и расположена снаружи филаментов, а устойчивое к протеазе ядро филаментов образует каркас PHF (Wischik, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 85:4884-8, 1988).

При применении в настоящем документе термин «антитела, которые связываются PHF-тау» относится к антителам, которые связываются с PHF-тау по результатам вестерн-блоттинга. Как правило, антитела, которые связываются PHF-тау, можно определять после окрашивания Кумасси приблизительно 500 нг PHF-тау после часового блокирования в 5%-м (мас./об.) обезжиренном сухом молоке (NFDM) в ТРИС-буферном солевом растворе (TBS-T) с добавкой 0,05% Tween-20. Антитела, которые связываются с PHF-тау, необязательно не связываются с контрольным тау-белком (SEQ ID NO: 31) по результатам вестерн-блоттинга при тестировании в условиях нагрузки антигеном, при этом и контрольный тау-белок, и PHF-тау одинаково определяют с помощью антител к тау-белку, которые не имеют предпочтительного связывания с эпитопами PHF-тау (например, антитело HT7, (ThermoScientific, Rockford, IL) (Mercken, et al. J Neurochem 58:548-53, 1992). Примером таких условий нагрузки антигеном является 500 нг PHF-тау и 200 нг контрольного тау-белка.

В настоящем документе применяются стандартные хорошо известные одно- и трехбуквенные коды аминокислот.

Композиции изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам анти-PHF-тау и применению подобных антител. Такие антитела анти-PHF-тау могут обладать свойством связываться с фосфорилированным эпитопом на PHF-тау или связываться с нефосфорилированным эпитопом на PHF-тау. Антитела анти-PHF-тау могут найти применение в качестве терапевтических агентов и в качестве исследовательских или диагностических реагентов для определения PHF-тау в биологических пробах, например в тканях или клетках.

В предпочтительных вариантах осуществления антитела изобретения имеют последовательности, представленные в таблице 1. PT82 представляет собой мышинное моноклональное антитело, а PT1B778, PT1B779, PT1B780, PT1B781 и PT1B782 - это

гуманизированные варианты PT82. Области CDR в последовательностях переменных областей подчеркнуты. Выделенные жирным шрифтом аминокислоты в областях CDR гуманизированных моноклональных антител указывают на замену по сравнению с последовательностью CDR PT82.

Таблица 1

mAb	Название		SEQ ID NO	Последовательность
PT82				
	V _H	CDR1	1	GFTFSNYWMN
		CDR2	2	QIRLQSDNYATRYAESVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	15	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS CVAS <u>GFTFSNYWM</u> <u>NWIRQSPEKGLEWVAQIRLQSDNYATRYAESVKGR</u> FTISRDESKTSVYLMNLRTEDTGIYYCTGG <u>T</u> TYW GQGLVTVSA
	V _L	CDR1	4	KASQNVGTAVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT
		Домен V _L	16	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCK KASQNVGTAVA W YQKPGQSPKLLIYS <u>SASIRYT</u> GVDPDRFTGSGSGTDFT LTINMQSEDLADYFCQQFSSYPYTFGGG T KLEIK
PT1B778				
	V _H	CDR1	7	NYWMN
		CDR2	8	QIRLQSDNYVTRYAASVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS <u>NYWMN</u> <u>WIRQAPGKGLEWVGQIRLQSDNYVTRYAASVKGRF</u> TISRDDSKNSVYLMNSLKTEDTAVYYCTGG <u>T</u> TYW GQGLVTVSS
	V _L	CDR1	9	KASQNVG TRVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT

		Домен V _L	18	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTRVAW YQQKPGKAPKLLIYSASIRYTGVPSTRFSGSGSGTEFT LTISSMQPEDFATYYCQQFSSYPYTFGQGGTKLEIK
PT1B779				
	V _H	CDR1	7	NYWMN
		CDR2	10	QIRLQDDNYATRYAASVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMN WIRQAPGKGLEWVGQIRLQDDNYATRYAASVKGR FTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCTGGTTY WGQGLVTVSS
	V _L	CDR1	11	KASQNVGTKVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT
		Домен V _L	20	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTKVAW YQQKPGKAPKLLIYSASIRYTGVPSTRFSGSGSGTEFT LTISSMQPEDFATYYCQQFSSYPYTFGQGGTKLEIK
PT1B780				
	V _H	CDR1	7	NYWMN
		CDR2	12	QIRLQSDNYATRYAASVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMN WIRQAPGKGLEWVGQIRLQSDNYATRYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTGGTTYW GQGLVTVSS
	V _L	CDR1	11	KASQNVGTKVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT
		Домен V _L	22	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTKVAW YQQKPGKAPKLLIYSASIRYTGVPSTRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPYTFGQGGTKLEIK

PT1B781				
	V _H	CDR1	7	NYWMN
		CDR2	13	QIRLQ R DNYATRYAASVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	23	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMN</u> WIRQAPGKGLEWVGQIRLQ R DNYATRYAASVKG R FTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCTGGTTY WGQGTLVTVSS
	V _L	CDR1	11	KASQNVG T KVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT
		Домен V _L	20	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVG T KVAW YQQKPGKAPKLLIYSASIRY T GVPSRFSGSGSGTEFT LTISSMQPEDFATYYCQQFSSYPY T FGQGTKLEIK
PT1B782				
	V _H	CDR1	7	NYWMN
		CDR2	14	QIRLQYDNYATRYAASVKG
		CDR3	3	GTTY
		Домен V _H	24	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMN</u> WIRQAPGKGLEWVGQIRLQYDNYATRYAASVKG R FTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCTGGTTY WGQGTLVTVSS
	V _L	CDR1	11	KASQNVG T KVA
		CDR2	5	SASIRYT
		CDR3	6	QQFSSYPYT
		Домен V _L	25	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVG T KVAWY QQKPGKAPKLLIYSASIRY T GVPSRFSGSGSGTEFTL TISSMQPEDFATYYCQQFSSYPY T FGQGTKLEIK

В одном варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент имеет тяжелую цепь, содержащую HCDR1 с SEQ ID NO:1 или 7; HCDR2 с SEQ ID NO:2, 8, 10, 12, 13 или 14; и HCDR3 с SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения имеет легкую цепь, содержащую LCDR1 с SEQ ID NO:4, 9 или 11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6.

В предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO:1; HCDR2 с SEQ ID NO:2 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:4; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:8 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:9; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:10 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:12 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:13 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6; или

HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:14 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6.

В других вариантах осуществления моноклональное антитело изобретения, которое связывается с PHF-тау, содержит одну или более областей CDR, которые совпадают по меньшей мере на 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с областью CDR по любой из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24, и переменную область легкой цепи, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:15, переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16;

переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:17, переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 18;

переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:19, переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20;

переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:21, переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22;

переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:23, переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:24, вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с РНФ-тау, содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% совпадает с любой из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере на 99% или 100% совпадает с любой из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25. В конкретном варианте осуществления области CDR соответствуют описанным в таблице 1, так что замены аминокислот находятся за пределами областей, не являющимися CDR вариабельной области.

В другом варианте осуществления выделенное антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 119-126 тау-белка человека, причем нумерация аминокислот дана согласно аминокислотной последовательности, представленной в последовательности SEQ ID NO:31.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, содержат пары вариабельных областей (одну для тяжелой и одну для легкой цепи), специалист в данной области способен распознать, что альтернативные варианты осуществления могут содержать одиночные вариабельные области тяжелой или легкой цепи. Одиночную вариабельную область можно применять для скрининга вариабельных доменов, способных к формированию двухдоменного специфического антигенсвязывающего фрагмента, способного, например, связываться с РНФ-тау. Такой скрининг можно осуществлять с помощью методов скрининга с фаговым дисплеем, например с применением иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в публикации РСТ № WO92/01047. Согласно этому подходу применяют отдельную колонию, содержащую клон с цепью Н либо L, для заражения полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), и полученный двухцепочечный специфичный антигенсвязывающий домен выбирают в соответствии с описанными методами фагового дисплея.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенное антитело, которое связывается с РНФ-тау, содержащее антигенсвязывающий сайт, имеющий вариабельную область тяжелой цепи (VH) по любой из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по любой из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25. В одном варианте осуществления выделенное антитело

изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область VH, имеющую идентификатор зародышевой линии по IMGT (Barbie and Lefranc, 1998, *Exp. Clin. Immunogenet*, 15: 171-183) IGHV6-3*01, и область VL, имеющую идентификатор зародышевой линии по IMGT IGKV6-13*01.

В любом из предшествующих вариантов осуществления выделенное антитело, которое связывается с PHF-тау, может быть гуманизировано.

Антитела настоящего изобретения могут быть сформированы различными методами, например с помощью гибридомного способа (Kohler and Milstein *Nature* 256:495-7, 1975). Химерные mAb, содержащие переменные области легкой и тяжелой цепей, полученные от антитела-донора (как правило, мышинового), ассоциированные с константными областями легкой и тяжелой цепей, полученными от антитела-акцептора (как правило, другого вида млекопитающих, такого как человек) могут быть получены способом, раскрытым в патенте США № 4,816,567. Антитела mAb с трансплантированной областью CDR, имеющие области CDR, полученные из донорного иммуноглобулина, отличного от человеческого (как правило, мышинового), при этом остальные полученные из иммуноглобулина части молекулы полученные

из одного или более иммуноглобулинов человека, могут быть получены методами, известными специалистам в данной области, такими как раскрытые в патенте США № 5,225,539. Полностью человеческие mAb, в которых отсутствуют любые не относящиеся к человеку последовательности, могут быть получены из трансгенных по иммуноглобулину человека мышей методами, указанными в (Lonberg, et al. *Nature* 368:856-9, 1994, Fishwild, et al. *Nat Biotechnol* 14:845-51, 1996, Mendez, et al. *Nat Genet* 15:146-56, 1997). Человеческие mAb также можно получить и оптимизировать из библиотек фагового дисплея (Knappik, et al. *J Mol Biol* 296:57-86, 2000, Krebs, et al. *J Immunol Methods* 254:67-84, 2001, Shi, et al. *J Mol Biol* 397:385-96, 2010).

Гуманизацию антитела можно осуществить с помощью хорошо известных способов, таких как перекладка определяющих специфичность остатков (SDRR) (публ. пат. США № 2010/0261620), перекладка переменного домена (resurfacing) (Padlan et al. *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991), супергуманизация (super humanization) (межд. публ. пат. № WO04/006955) и оптимизация содержания человеческой последовательности (патент США № 7,657,380). Специалисты в данной области могут выбрать пригодные для трансплантации/гуманизации каркасные последовательности человека из соответствующих баз данных. Выбранные каркасы можно дополнительно модифицировать для сохранения или повышения аффинности связывания методами, которые описаны, например, в работе Квин et al. (Queen, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:10029-33, 1989) или в публ. пат. США № 2011/0092372.

Получение PHF-тау для применения в качестве антигена для иммунизации или выделения антител из библиотек фагового дисплея можно осуществить любым соответствующим методом. В примере способа PHF-тау выделяют из мозга пациентов с БА, применяя хорошо известные протоколы, такие, как описаны в работе Гринберг и

Дэвис (Greenberg and Davies Proc Natl Acad Sci U S A 87:5827-31, 1990). РНФ-тау можно выделить из коры головного мозга при посмертном вскрытии пациента с болезнью Альцгеймера. Чистоту и статус избыточного фосфорилирования выделенного РНФ-тау характеризуют с помощью антител, которые, как известно, реагируют с РНФ-тау. В традиционной процедуре получения РНФ-тау полосы для избыточно фосфорилированной изоформы, мигрирующие в вестерн-блоттинге приблизительно при 60, 64, 68 и 72 кДа (Spillantini and Goedert Trends Neurosci 21:428-33, 1998), определяют применением антитела АТ8, которое специфически связывается с избыточно фосфорилированным РНФ-тау, но не с дефосфорилированным РНФ-тау.

Антитела настоящего изобретения могут характеризоваться отсутствием связывания с контрольным тау-белком с SEQ ID NO: 31. Такие антитела можно получать с применением описанных выше способов и тестировать антитела на отсутствие их связывания с контрольным тау-белком в вестерн-блоттинге после окрашивания Кумасси, как описано выше. Контрольный тау-белок может быть экспрессирован рекомбинантным способом и очищен с применением стандартных способов.

Антитело изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно оценивать на специфичность, например с применением иммуногистохимии на контрольных срезах и срезах тканей мозга пациентов с БА.

Антитела изобретения могут иметь аффинность к РНФ-тау с константой диссоциации (K_D) менее чем или равной приблизительно 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М. Аффинность данной молекулы к РНФ-тау может быть определена экспериментально с применением любого соответствующего способа. Такие способы могут включать применение оборудования Вiасоре, ProteOn или KinExА, ИФА или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области.

Другим аспектом изобретения является выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует по связыванию с РНФ-тау с моноклональным антителом, содержащим антигенсвязывающий сайт, имеющий переменную область тяжелой цепи по любой из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24 и переменную область легкой цепи по любой из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25.

Другим аспектом изобретения является выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует по связыванию с РНФ-тау с моноклональным антителом, содержащим антигенсвязывающий сайт, имеющий переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:15 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:17 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:19 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; переменную область тяжелой

цепи с последовательностью SEQ ID NO:21 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:23 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:24 и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

Конкуренцию в связывании с PHF-тау можно количественно определять *in vitro* с помощью хорошо известных способов. Например, связывание антитела MSD Sulfo-Tag™, меченного с помощью NHS-эфиров, с PHF-тау в присутствии немеченого антитела можно количественно определять методом иммуноанализа с электрохемилюминесцентным детектированием.

В дополнение к конкурентному связыванию для определения эпитопа связывания антител изобретения можно применять ряд хорошо известных способов. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно применять анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено избирательное замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела с целью картирования участков антигена, способных связываться с антителом. Для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот может быть применен сегментный и точечный мутагенез антигена. Для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа, применяется со-кристаллическая структура комплекса антиген - антитело.

Антитела изобретения могут представлять собой моноклональные антитела изотипов IgG, IgD, IgA или IgM. Антитела изобретения могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Пример биспецифического антитела может связываться с двумя различными эпитопами на PHF-тау или с PHF-тау и амилоидом бета (A β). Другой пример биспецифического антитела может связываться с PHF-тау и с эндогенным рецептором трансцитоза гематоэнцефалического барьера, таким как инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, рецептор инсулинподобного фактора роста-1 и рецептор липопротеина. Пример антитела представляет собой антитело типа IgG1.

Иммуноэффекторные свойства антител изобретения также могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc, ответственными за эти действия. Например, Fc-область может содержать Fc-область человеческого IgG4, имеющую замены, которые исключают эффекторную функцию. Таким образом, выделенное антитело дополнительно содержит Fc-область, имеющую модифицированную

Fc-область человеческого IgG4, содержащую одну или более из следующих замен: замену пролина на глутамат в положении 233, аланина или валина на фенилаланин в положении 234 и аланина или глутамата на лейцин в положении 235 (нумерация ЕС, Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242). Удаление участка N-связанного гликозилирования в Fc-области IgG4 путем замены аланина на аспарагин в положении 297 (нумерация ЕС) является еще одним способом устранения остаточной эффекторной активности. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие период полужизни антител, могут также улучшить фармакокинетические свойства (Strohl Curr Opin Biotechnol 20:685-91, 2009).

Кроме того, антитела изобретения могут быть модифицированы пост-трансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как присоединение молекулы полиэтиленгликоля (пегилирование) или липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела изобретения могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пэгилированы) для улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методами, известными специалистам в данной области. Отмечено, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ улучшает фармакодинамику, не оказывая влияния на функцию (Knight, et al. Platelets 15:409-18, 2004, Leong, et al. Cytokine 16:106-19, 2001, Yang, et al. Protein Eng 16:761-70, 2003).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий антитела изобретения или их комплементы или фрагменты. Примерами выделенных полинуклеотидов являются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, включающие тяжелую цепь иммуноглобулина, включающую HCDR1 с SEQ ID NO:1 или 7; HCDR2 с SEQ ID NO:2, 8, 10, 12, 13 или 14; и HCDR3 с SEQ ID NO:3, и которые имеют легкую цепь, включающую LCDR1 с SEQ ID NO:4, 9 или 11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6. Дополнительными примерами выделенных полинуклеотидов являются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие переменную область тяжелой цепи по любой из последовательностей SEQ ID NO:15, 17, 19, 21, 23 или 24 и переменную область легкой цепи по любой из последовательностей SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22 и 25.

Другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность применения кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела изобретения, также находятся в пределах объема изобретения. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получить с применением хорошо известных рекомбинантных или синтетических методов. Кодирующие моноклональные антитела ДНК легко выделяются и секвенируются с применением способов, известных специалистам в данной области. При получении гибридомы такие клетки могут служить источником такой ДНК. Альтернативно,

применение дисплейных методов, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции связаны друг с другом, таких как библиотеки фагового или рибосомального дисплея, упрощает выбор связывающего фрагмента и нуклеиновой кислоты. После выбора фага кодирующие области антитела из фага можно выделять и применять их для получения полных антител, включая человеческие антитела или любого иного требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессировать их в любом необходимом организме-хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения полинуклеотидов изобретения в данный организм или генетическое окружение каким-либо образом.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, включающую любой из полинуклеотидов изобретения. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, бактериальные, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ получения антител, которые связываются с РНФ-тау, включающий культивирование клеток-хозяев изобретения и отбор антител, производимых клетками-хозяевами. Способы получения антител и их очистки хорошо известны специалистам в данной области.

Способы лечения

Анти-РНФ-тау антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты, включая фрагменты Fab, (Fab')₂, scFv, или антитела, содержащие антигенсвязывающие сайты антител изобретения, можно применять для лечения, ослабления или профилактики появления симптомов у пациентов, имеющих нейродегенеративное заболевание, которое связано с патологическим агрегированием тау-белка в мозге.

Заболевания (таупатия), которые можно лечить способами изобретения, включают в себя, без ограничений, одно или более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь

Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза взора, кортико-базальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофический боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдрома Дауна, синдрома Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдрома Галлервордена - Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, не-Гуамовой болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и деменции боксеров.

[0003] Заболевание (таупатия) предпочтительно представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), FTDP-17 или прогрессирующий супрануклеарный парез взора.

[0004] Наиболее предпочтительно заболевание (таупатия) представляет собой болезнь Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера).

Не стремясь ограничить себя какой-то конкретной теорией, авторы изобретения считают, что антитела настоящего изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут оказывать свой благоприятный эффект путем снижения патологического агрегирования тау-белка (например, путем профилактики агрегирования и/или путем уменьшения уже произошедшего агрегирования), и тем самым количества PHF-тау, в мозге. Антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять для лечения пациента-животного, принадлежащего к любой классификации. К примерам таких животных относятся млекопитающие, такие как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут найти применение для приготовления лекарственного препарата для лечения БА, причем лекарственный препарат готовится для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ уменьшения агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента в течение времени, достаточного для уменьшения агрегирования тау-белка.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения или ослабления симптомов нейродегенеративного заболевания, которое связано с агрегированием тау-белка у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела изобретения или его

антигенсвязывающего фрагмента в течение времени, достаточного для лечения или ослабления симптомов нейродегенеративного заболевания.

В любом из указанных выше вариантов осуществления нейродегенеративное заболевание, которое связано с агрегированием тау-белка, представляет собой таупатию.

При применении в настоящем документе термин «таупатия» охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологическим агрегированием тау-белка в мозге. Помимо семейной и спорадической БА другими примерами таупатии являются лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий супрануклеарный парез взора, кортико-базальная дегенерация, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофический боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдром Дауна, синдром Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдром Галлервордена - Шпатца, миозит с включениями, болезнь Крейцфельда - Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна - Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, не-Гуамова болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как деменция боксеров. (Morris, et al. *Neuron* 70:410-26, 2011).

Связанный с таупатией поведенческий фенотип включает в себя нарушения когнитивных функций, ранние изменения личности и расторможенность, апатию, патологическое безволие, задержку речи, нарушение целенаправленных движений, навязчивое повторение, стереотипные движения/поведение, гиперорализм, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание, аграмматическую речь с частыми парафазийными ошибками, но относительной сохранностью понимания, нарушение восприятия и трудности в подборе слов, медленно прогрессирующую неустойчивость походки, ретропульсию, застывание, частые падения, нечувствительную к леводопе аксиальную ригидность, супрануклеарный парез взора, прямоугольные саккадические осцилляции взора, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, кортикальную потерю чувствительности и тремор.

К подлежащим лечению пациентам относятся не имеющие симптомов лица, подверженные риску БА или иной таупатии, а также пациенты, имеющие выраженные симптомы. Подлежащие лечению пациенты включают лиц, у которых имеется известный генетический риск БА, например присутствие заболевания в семейном анамнезе, или наличие генетических факторов риска в геноме. Примерами факторов 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, присутствие в семейном анамнезе гиперхолестеролемии или атеросклероза. Лиц, в настоящее время страдающих от БА, можно отличить от лиц с характерной деменцией по наличию описанных выше факторов риска. Кроме того, для выявления лиц, имеющих БА, имеется ряд диагностических тестов. Среди них - измерение уровней тау-белка и Аβ42 в спинномозговой жидкости. Повышенный уровень тау-белка и пониженный уровень Аβ42 указывают на наличие БА. Лиц, страдающих БА также можно диагностировать по критериям Ассоциации болезни Альцгеймера и связанных расстройств (AD and Related Disorders Association).

Введение/фармацевтические композиции

Анти-РНФ-тау антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты можно применять в качестве как терапевтических, так и профилактических средств для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с патологическим агрегированием тау-белка, таких как БА или иные таупатии. Для не имеющих симптомов пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, приблизительно в 10, 15, 20, 25, 30 лет). Однако обычно необходимость в начале лечения не возникает, пока пациент не достигнет возраста приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, включает введение множества доз в течение некоторого периода времени. Ход лечения можно контролировать путем измерения ответа на терапевтический агент во времени по антителам или активированным Т-клеткам или В-клеткам. При падении ответа показаны повторные дозы.

В профилактических приложениях фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, уязвимому к или иным образом подверженному риску БА или иной таупатии в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения степени тяжести или задержки развития заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие в процессе развития заболевания. В терапевтических приложениях композиции или лекарственные средства вводят пациенту, у которого подозревается или уже подтверждено наличие такого заболевания в мере, достаточной для ослабления, прекращения или задержки развития любого из симптомов заболевания (биохимического, гистологического и/или поведенческого). Введение терапевтического агента может уменьшить или устранить умеренные нарушения когнитивных функций у пациентов, у которых еще не развилась характерная патология расстройства. Количество, достаточное для проведения терапевтического или профилактического лечения, определяется как терапевтически или профилактически эффективная доза. И в профилактическом, и в терапевтическом режиме композиции или лекарственные средства обычно вводят несколькими дозами до достижения достаточного иммунного ответа.

Анти-РНФ-тау антитела изобретения или их фрагменты можно вводить в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения связанных

нейродегенеративных заболеваний.

В способах изобретения «терапевтически эффективное количество» антитела при лечении или облегчении симптомов таупатии можно определить стандартными исследовательскими методами. Например, дозировку антитела можно определить путем введения агента соответствующим животным моделям, хорошо известным специалистам в данной области.

Кроме того, для определения диапазона оптимальной дозы, необязательно могут быть применены анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы (например, посредством клинических испытаний) могут осуществлять специалисты в данной области на основании нескольких факторов. Такие факторы включают: подлежащее лечению или предотвращению заболевание, соответствующие симптомы, массу тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалисту факторы. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также будет зависеть от пути введения и степени тяжести заболевания и должна определяться на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделей.

Для введения предназначенных для терапевтического применения антител изобретения можно применять любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента пациенту. Фармацевтические композиции таких антител применяются для парентерального введения, например внутривенного, внутримышечного, внутривенного, подкожного, интраназального или интракраниального, или их могут вводить в спинномозговую жидкость головного или спинного мозга.

Антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены в качестве фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела или фрагмента в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному веществу, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят антитело. Такие фармацевтические носители могут представлять собой жидкости, такие как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое, соевое, минеральное, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как регуляторы pH, буферные вещества, стабилизаторы, загустители, увлажнители, пигменты и т. п. Концентрация антител изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т. е. от менее чем около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15% или 20% по массе, и определяется

преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т. п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

Введение можно осуществлять по схеме с единственной дозой или по схеме со множеством доз, при которой основной курс лечения может включать 1-10 отдельных доз, после чего следуют другие дозы, вводимые в последующие временные интервалы, необходимые для поддержания и/или усиления ответа, например, вторая доза через 1-4 месяца и, если необходимо, последующая (-ие) доза (-ы) через несколько месяцев. К примерам приемлемых схем лечения относятся: (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, индуцирующие получение желательных ответов, благодаря которым предположительно уменьшатся симптомы или тяжесть заболевания.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной буферной воды и от около 1 нг до около 100 мг, от около 50 нг до около 30 мг, или от около 5 мг до около 25 мг антитела изобретения. Подобным образом, предложенная в изобретении фармацевтическая композиция для внутривенного введения может содержать приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и от около 1 мг до около 30 мг, или от около 5 мг до около 25 мг антитела изобретения. Существующие способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Антитела изобретения и их фрагменты можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в приемлемом носителе перед применением. Было показано, что этот способ эффективен для антител и других белковых препаратов, при этом могут быть применены известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

Диагностические методы и наборы

Антитела изобретения можно применять в способах диагностики БА или иной таупатии у пациента. Такой способ включает обнаружение у пациента наличия РНФ-тау с применением диагностического реагента, такого как антитело настоящего изобретения или его фрагмент.

РНФ-тау может быть определен во взятой у пациента биологической пробе (например, крови, моче, спинномозговой жидкости) путем приведения биологической пробы в контакт с диагностическим реагентом на основе антител и обнаружении связывания диагностического реагента на основе антител с РНФ-тау во взятой у пациента пробе. Анализ для проведения такого обнаружения включает в себя хорошо известные способы, такие как ИФА, иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или *in vivo* визуализацию.

Диагностические антитела или аналогичные реагенты могут быть введены путем внутривенной инъекции в тело пациента или напрямую в мозг соответствующим путем, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяина, как описано в приведенных выше примерах. Дозировки антител должны находиться в тех же диапазонах, как и для

способов лечения. Как правило, антитела метят, хотя в некоторых способах первичное антитело с аффинностью к РНФ-тау выбирают немеченым, но применяют вторичный метящий агент для связывания с первичным антителом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка пригодна для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток件годно для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки могут быть также определены с применением ПЭТ или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

Диагностирование выполняют путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых РНФ-тау, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков во взятой у пациента пробе или у пациента с соответствующими базовыми значениями. Базовые значения могут представлять собой средние уровни значений в некоторой популяции не имеющих заболевания лиц. Базовые значения могут также представлять собой предшествующие уровни значений, определенные у того же пациента.

Описанные выше диагностические способы можно также применять для контроля ответа пациента на лечение путем обнаружения присутствия РНФ-тау у пациента до, в ходе или после лечения. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. В биологических жидкостях значения могут также временно возрасть при выводе патологического тау-белка из мозга.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на создание набора для выполнения описанных выше методов диагностики и контроля. Как правило, такие наборы содержат диагностический реагент, такой как антитело изобретения, и необязательно детектируемую метку. Диагностическое антитело может само содержать детектируемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т. д.), которая определяется напрямую или с помощью вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином). Альтернативно можно применять второй реагент, содержащий детектируемую метку, причем второй реагент обладает специфичностью связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, приемлемом для измерения уровня РНФ-тау в биологической пробе, антитела набора могут поставляться предварительно связанными с твердой фазой, например с лунками микротитрационного планшета.

Содержание всех указанных ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), упомянутых в настоящей заявке, явным образом полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример 1

Очистка парных спиральных филаментов тау (РНФ-тау)

РНФ-тау частично очищали с применением модифицированного способа Гринберг и Дэвис (Greenberg and Davies Proc Natl Acad Sci U S A 87:5827-31, 1990). Вкратце, частично очищали полученную после вскрытия ткань коры головного мозга пациента с гистологически подтвержденной болезнью Альцгеймера. Как правило, 5 мг лобной коры гомогенизировали в 10 объемах холодного буфера Н (10 мМ Трис, 800 мМ NaCl, 1 мМ

ЭГТК и 10% сахарозы/pH 7,4) с применением стеклянного/тефлонового гомогенизатора Поттера (IKA Works, Inc; г. Штауфен, Германия) при 1000 об/мин. Гомогенизированный материал центрифугировали при 27 000 g в течение 20 мин на роторе Sorvall SS34. Осадок удаляли, супернатант доводили до итоговой концентрации 1% (мас./об.) N-лаурилсаркозина и 1% (об./об.) 2-меркаптоэтанола и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С. Затем супернатант центрифугировали при 108 000 g в течение 35 мин при температуре 20 °С в роторе Beckman 60Ti. Осадок аккуратно промывали в PBS и суспендировали в PBS. Супернатант центрифугировали второй раз, как описано, и полученный осадок растворяли, разделяли на аликвоты и замораживали при -80 °С. Качество препаратов РНФ-тау оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия 12% (ДНС-ПААГ) и последующим вестерн-блоттингом с антителами АТ8 и НТ7 к тау-белку (ThermoScientific, г. Рокфорд, штат Иллинойс). Препарат РНФ-тау хорошего качества состоит из 4 полос, имеющих молекулярные массы приблизительно 60, 64, 66 и 72 кДа, на вестерн-блоттинге, определяемом с антителами, реагирующими с избыточно фосфорилированными РНФ-тау, такими как АТ8. Из одного и того же образца мозга готовили по два отдельных препарата РНФ-тау со сравнимым качеством и чистотой. Препарат 1 применяли для иммунизации.

Пример 2

Получение моноклональных антител к РНФ-тау

Анти-РНФ-тау антитела получали с применением стандартной гибридомной технологии в нормальной мышинной популяции Balb/c (Kohler and Milstein Nature 256:495-7, 1975). Полученные гибридомы высевали в 96-луночные планшеты и через 10 дней проводили скрининг прямым ИФА на нанесенном в количестве 25 нг/лунку РНФ-тау, как описано ниже. Положительные клетки проверяли на кросс-реактивность на нанесенном в количестве 10 нг/лунку контрольном тау-белке (SEQ ID NO: 31), экспрессированном в клетках E. Coli BL21 и очищенном термообработкой и осаждением сульфатом аммония. Было обнаружено, что РТ82 связывается как с РНФ тау, так и с контрольным тау-белком (SEQ ID NO:31).

Положительные клетки немедленно субклонировали, а положительные клоны замораживали в жидком азоте. Все гибридомы выращивали в модифицированной среде Игла по способу Дульбекко с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Европа), добавки для слияния и клонирования гибридомы (2%) (Roche, г. Брюссель, Бельгия) 2% НТ (Sigma, США), 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин и пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (50 мг/мл).

Вариабельные области антитела клонировали из выбранных гибридомных клеток на каркас мышинового IgG1/IgG2/к и экспрессировали и очищали стандартными способами. Вкратце, гибридомные клетки РТ/82 лизировали в буфере RLT (№ 79216 по каталогу Qiagen) и замораживали при -70 °С. Лизат оттаивали при 37 °С и выделяли РНК с применением набора RNeasy 96 Kit (№ 74182 по каталогу Qiagen).

Аликвоту РНК применяли для синтеза кДНК, применяя смесь праймеров для ген-

специфичной обратной транскрипции с применением праймеров, сконструированных для отжига к константной области тяжелой цепи IgG мыши, легкой цепи каппа мыши или легкой цепи лямбда мыши.

Аликвоту кДНК применяли в реакциях ПЦР с наборами мышинных праймеров, выполненных с возможностью амплификации переменных областей тяжелой цепи IgG, переменных областей легкой цепи каппа или переменных областей легкой цепи лямбда. Прямые праймеры состояли из множества праймеров, выполненных с возможностью отжига к каркасной области 1, а обратный праймер был выполнен с возможностью отжига к константной области. Аликвоту продуктов ПЦР проверяли на 2%-м агарозном геле, и продукты ПЦР для тяжелой цепи и легкой цепи каппа давали видимую полосу правильного размера.

Продукты ПЦР для тяжелой цепи и легкой цепи каппа секвенировали (методом Сэнгера), применяя обратный праймер для тяжелой цепи или легкой цепи каппа, выполненный с возможностью отжига к соответствующей константной области. Полученные последовательности анализировали и совмещали для выявления зародышевой линии мыши с наилучшим соответствием. Первые десять аминокислот в последовательности каркасной области 1 для тяжелой цепи и легкой цепи каппа заменяли с применением соответствующей им последовательности зародышевой линии. Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи IgG и легкой цепи каппа оптимизировали по кодонам и синтезировали. Оптимизированные по кодонам переменные области тяжелой цепи IgG и легкой цепи каппа синтезировали и клонировали полученные фрагменты в экспрессионные векторы для тяжелой цепи изотипа IgG2a и изотипа легкой цепи каппа мыши.

Переменные области антитела клонировали из выбранных гибридомных клеток, секвенировали с применением стандартных способов и субклонировали в экспрессионные векторы для mAb и Fab. Mab получали на каркасе мышинового IgG2a/k и экспрессировали и очищали аффинной хроматографией (белок A). Fab получали как химерные варианты с мышинными переменными областями, слитыми с константными доменами IgG1/k человека и с гистидиновой меткой на C-конце тяжелой цепи. Fab временно экспрессировали в клетках НЕК293F и очищали аффинной хроматографией (HisTrap).

Пример 3

Количественная оценка связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Взаимодействия с RHF-тау и рекомбинантным тау-белком оценивали методом SPR на анализаторе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния) или Biacore T200 (Biacore, г. Уппсала, Швеция) для PT82 и его Fab-фрагмента с RHF и растворимым (2N4R) тау-белком. В таблице 2 приведены показательные результаты оценки аффинности PT82 и его Fab-фрагмента к RHF-тау и растворимому тау-белку.

Таблица 2. Значения аффинности для PT82 и его Fab-фрагмента по данным SPR

mAb/Fab	RHF-тау K_D (нМ)	Раств-тау K_D (нМ)
----------------	--------------------------------------	--

mAb PT82	2853 ± 281	NT
PT82 Fab	5006 ± 626	1841 (1410-2270)

И PT82, и его Fab-фрагмент связываются с РНФ-тау. При этом Fab-фрагмент PT82 также связывается с растворимым тау-белком (см. также Фиг. 1). Результаты данного исследования показали, что PT82 связывается с РНФ-тау и с растворимым тау-белком.

Пример 4

Прямой ИФА для выбора антител

РНФ-тау в течение ночи наносили по 25 нг/лунку при температуре 4 °С в плоскодонных 96-луночных микротитрационных планшетах высокого связывания NUNC Maxisorp (Life Technologies) в 50 мкл/лунку буфера для нанесения (10 mM Трис, 10 mM NaCl и 10 mM NaN₃, pH 8,5). На следующий день планшеты блокировали 75 мкл/лунку 0,1% казеина в PBS в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. После промывки связанные моноклональные антитела определяли 50 мкл/лунку овечьим анти-мышинным IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена, в течение 1 часа при температуре 37 °С (Amersham-Pharmacia Biotech). Оба реагента разводили в растворе 0,1% казеина/PBS. Планшеты промывали и добавляли 50 мкл раствора 0,42 mM 3,5,3',5'-тетраметилбензидина, 0,003% (об./об.) H₂O₂ в 100 mM лимонной кислоты и 100 mM динатрия гидрофосфата (pH 4,3) в качестве субстрата. Реакция могла продолжаться максимум в течение 15 минут на планшетном шейкере при комнатной температуре, после чего развитие окраски останавливали добавлением 2 н. H₂SO₄, 50 мкл/лунку, а планшеты считывали с помощью сканирующего спектрофотометра при длине волны 450 нм (Thermomax, Molecular Devices).

Пример 5

Связывание с рекомбинантным WT (2N4R; SEQ ID NO:31) тау-белком анализировали методом ИФА, непосредственно нанося полноразмерный тау-белок (1 нг/мл или 10 нг/мл) на планшет и инкубируя с различными концентрациями рекомбинантно- или гибридомно-полученного антитела PT82 (Фиг. 2). После инкубации с антителами планшет опять промывали и добавляли по 50 мкл на лунку меченного пероксидазой хрена (HRPO) анти-мышинного антитела (GE Healthcare) (разбавленного 1 : 10 000 в блокирующем буфере). После еще одной стадии промывки выполняли обнаружение тетраметилбензидином с применением One step TMB (Thermo Scientific), следуя рекомендациям производителя. Планшеты анализировали с помощью многометочного сканирующего спектрофотометра EnVision® 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer, г. Уолтем, штат Массачусетс, США). Кривые связывания строили с применением программного пакета GraphPad Prism7.0. Как и ожидалось, меньшие наносимые концентрации тау-белка давали меньшие максимальные величины (например, если сравнить красные и зеленые кривые, на которых показано связывание рекомбинантных антител соответственно при 1 нг/мл и 10 нг/мл). Значимых различий между профилями связывания антител, полученных рекомбинантным или гибридомным

способом не наблюдалось.

Пример 6

Анализ по совместной инкубации с тканями спинного мозга (анализ FRET)

Содержащие зародыши тау-белка гомогенаты для совместной инкубации были получены из тканей спинного мозга трансгенных животных P301S в возрасте 22-23 недели, которые содержат агрегированный трансгенный тау-белок человека (Фиг. 3А). В качестве клеток-реципиентов в данном анализе применяли клетки НЕК со стабильной экспрессией K18/P301L-YFP и K18/P301L-CFP (Holmes et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 111(41):E4376-85, 2014). Содержащие зародыши тау-белка гомогенаты инкубировали совместно с отрицательным контролем или с антителом РТ82 и полученную смесь добавляли к содержащим хромофор-K18 клеткам-реципиентам НЕК на 72 часа. Образование агрегатов K18 измеряли путем подсчета FRET-положительных клеток с применением флуоресцентно-активированной сортировки (FACS).

РТ82 блокировал индукцию агрегирования тау-белка при концентрации начиная от 3 нМ (Фиг. 3В).

Пример 7

Клеточный анализ методом иммунодеплеции

Чтобы изучить, связана ли максимальная процентная величина ингибирования с плотностью эпитопов на зародышах или с количеством зародышей, которые содержат эпитоп для РТ82, были проведены анализы методом иммунодеплеции (Фиг. 4А). В анализе методом иммунодеплеции зародыши тау-белка инкубировали с отрицательным контролем или с антителом РТ82 и удаляли их из раствора гранулами с белком G. Супернатант после деплеции проверяли на остаточную способность к зародышеобразованию в содержащих хромофор-K18 клетках НЕК и анализировали методом FACS, как описано ранее (Holmes et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 111(41):E4376-85, 2014), или проверяли на уровни агрегированного тау-белка, применяя селективный по агрегированию тау-белка анализ.

Гомогенаты для иммунодеплеции, содержащие зародыши тау-белка, получали из тканей спинного мозга трансгенных животных P301S в возрасте 22-23 недели или из криоконсервированных тканей мозга человека с БА. В анализе иммунодеплеции с применением тканей мозга человека с БА супернатант после деплеции проверяли в присутствии трансфекционного реагента Липофектамин2000 для получения приемлемого аналитического окна.

Для потенциала к зародышеобразованию тау-белка (измерен в анализе FRET; Фиг. 4В) и уровней агрегирования тау-белка (измерены методом селективного к агрегированию тау-белка анализа MSD; Фиг. 4С) оказалось возможным провести деплецию РТ82 в экстрактах спинного мозга и полных гомогенатах тканей мозга человека с БА. РТ82 ингибировало зародыши тау-белка, полученные из лизатов как тканей мозга человека с БА, так и спинного мозга животных TgP301S. Деплеция зародышей тау-белка РТ82 в экстрактах спинного мозга была практически полной.

Пример 8

Эффективность *in vivo* мышинных РТ82 в модели инъекции ePHF

Была создана трансгенная модель инъекции в мышь Р301L, в которой вызывающий агрегирование фрагмент тау-белка, такой как синтетические фибрилы K18 (Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006) или зародыши PFH-тау, полученные из тканей мозга человека с БА, вводят в область коры головного мозга или гиппокампа модели трансгенной мыши Р301L в возрасте, когда автономное агрегирование клеток еще не началось. Модель инъекции призвана имитировать критический компонент внеклеточного зародышеобразования в распространении тау-белка. Введенные фибрилы K18 или зародыши тау-белка индуцируют таупатию на участке инъекции и, в меньшей степени, в связанной контралатеральной области (Peeraer et al., *Neurobiol Dis*. 73:83-95, 2015). Модель позволяет проверять потенциал к подавлению зародышеобразования антител, таких как антитела к тау-белку настоящего изобретения, при совместной инъекции с полученными из тканей мозга человека с БА зародышами PFH-тау или фибрилами K18 (Iba et al., 2015, *J Neurosci*. 33(3):1024-37, 2013; Iba et al., *Acta Neuropathol*. 130(3):349-62).

Кортикальная инъекция нерастворимой в саркозиде фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывает медленно прогрессирующее возрастание агрегирования тау-белка. В инъектированном полушарии первые измеримые сигналы появляются через 1 месяц после инъекции и прогрессируют далее через 3 месяца после инъекции. Через пять месяцев после инъекции у некоторых животных начинается образование клубков, вызываемое мутацией Р301L (Terwel et al., 2005, Id.). Уровень окрашивания AT8 возрастает между 1 и 3 месяцами (отн. пациента с РТ3), поэтому эксперименты по эффективности антител анализируются через 2 месяца после совместной инъекции. Кроме того, гиппокампальная инъекция нерастворимой в саркозиде фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывает дозозависимое прогрессирующее возрастание агрегирования тау-белка по результатам анализа на платформе MesoScale Discoveries (MSD) нерастворимых в саркозиде фракций из инъектированных полушарий.

Лечение животных и интракраниальная инъекция

Для инъекционных исследований применяли трансгенных мышей тау-Р301L, у которых экспрессировалась самая длинная изоформа человеческого тау-белка с мутацией Р301L (тау-4R/2N-Р301L) (Terwel et al., 2005, Id.), для проведения хирургии в возрасте 3 месяцев. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколами, одобренными локальными комитетами по этике. Для стереотактической хирургии мыши получали одностороннюю (правое полушарие) инъекцию в гиппокамп (AP -2,0, ML +2,0 (через темя), DV 1,8 мм (через твердую оболочку)) 3 мкл (скорость 0,25 мкл/мин) нерастворимого в саркозиде препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (обогащенный парными спиральными филаментами, ePHF) при наличии или отсутствии моноклональных антител. Мышей умерщвляли для вскрытия (через 2 месяца после интракраниальной инъекции).

Процедура экстракции

Ткань из инъектированного полушария мыши взвешивали и гомогенизировали в 6 объемах гомогенизационного буфера (10 мМ Трис HCl (pH 7,6); 0,8 мМ NaCl; 10% мас./об. сахарозы; 1 мМ ЭГТК; смесь для ингибирования фосфатазы PhosStop; не содержащие ЭДТК мини ингибиторы протеаз). Гомогенат центрифугировали при 28 000 x г в течение 20 минут и после отбора аликвоты из полученного супернатанта (полный гомогенат) добавляли 1% N-лаурилсаркозина. Через 90 минут (900 об/мин, 37 °С) растворы повторно центрифугировали при 184 000 x г в течение 1 часа. Супернатанты сохраняли как растворимую в саркозиде фракцию, а содержащий нерастворимый в саркозиде материал осадок ресуспендировали в гомогенизационном буфере.

Биохимический анализ

Наносимые антитела (AT8) разводили в PBS (1 мкг/мл) и разливали аликвоты в планшеты для анализа MSD (30 мкл на лунку) (L15XA, Mesoscale Discoveries), которые инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. После промывки 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20 планшеты блокировали 0,1% казеина в PBS и еще раз промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20. После добавления проб и стандартов (и те и другие растворенные в 0,1% казеина в PBS) планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. Затем планшеты промывали 5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20, добавляли конъюгированные с меткой SULFO-TAG™ детекторные антитела (AT8) в 0,1% казеина в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на 600 об/мин. После последней промывки (5×200 мкл PBS/0,5% Tween-20) добавляли 150 мкл 2 X буфера T и считывали планшеты на визуализаторе платформы MSD. Необработанные сигналы нормировали по стандартной кривой, содержащей 16 разбавлений нерастворимого в саркозиде препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (ePHF) и выражали в единицах условной концентрации (отн. ед.) ePHF. Статистический анализ (дисперсионный анализ (ANOVA) с постпроверкой по критерию Бонферрони) проводили в программном пакете GraphPad prism и с помощью разработанного в лаборатории приложения для автоматизированного анализа.

Результаты

Активность мышинового PT82 (экспрессируемого рекомбинантным способом как IgG2a) в модели совместной инъекции в гиппокамп сравнивали с активностью AT180 и PT3 в одном исследовании (Фиг. 5, таблица 3). Антитела (4,5 пмоль) вводили совместно с ePHF тау (0,6 пмоль) в кору головного мозга. В каждой группе применяли по пятнадцать животных. Совместная инъекция PT82 соответственно ослабила индуцированное ePHF агрегирование тау-белка у мышей P301L (Фиг. 5А и 5В). Этот эффект наблюдали в полном гомогенате (Фиг. 5А) и нерастворимых в саркозиде гомогенатах (Фиг. 5В).

Таблица 3. Сводка результатов по функциональному тестированию в модели инъекции

		AT180	PT3	PT82
полный гомогенат	% ингибирования	63,796076	54,4989249	49,85795

	Р-значение	0,000145	0,000806	0,001078
нерастворимая фракция	% ингибирования	55,915265	52,9579764	51,86379
	Р-значение*	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

* Статистический анализ выполняли методом однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

В последующем исследовании сравнивали эффективность по РТЗ и РТ82 при периферийном введении (20 мг/кг; 2х/неделю) антитела после интракраниальной инъекции РНФ (Фиг. 6А) и совместной интракраниальной инъекции (Фиг. 6В) антитела+РНФ. Периферийное введение начинали за 2 недели до интракраниальной инъекции РНФ и продолжали в течение активной фазы эксперимента. В таблице 4 показаны количества антител, используемых в экспериментах. В согласии с первым исследованием совместное введение РТЗ и РТ82 снижало сигнал индуцированного еРНФ агрегирования в нерастворимых в саркозиле фракциях (Фиг. 6С и таблица 5) и в полных гомогенатах тканей мозга (Фиг. 6D и таблица 5). В дополнение к этому периферийное введение антител значительно ингибировало индуцированное еРНФ зародышеобразование.

Таблица 4. Количества используемых реагентов

Группа	Количество еРНФ (пмоль)	Количество антитела для совместной инъекции (пмоль)	Доза антитела для периферийной инъекции (мг/кг)	n
IgG-G2a	0,4	3	20	15
РТЗ	0,4	3	-	12
РТЗ	0,4	-	20	14
РТ82	0,4	3	-	12
РТ82	0,4	-	20	15

Таблица 5. Сводка результатов по функциональному тестированию в модели инъекции

		РТЗ совм. инъекц.	РТЗ ИП	РТ82 совм. инъекц.	РТ82 ИП
полный гомогенат	% ингибирования	73,34	66,68	58,23	49,10
	Р-значение*	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
нерастворимая фракция	% ингибирования	77,07	69,36	60,64	66,53
	Р-значение*	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

* Статистический анализ выполняли методом однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

Пример 9

Синтез пептидных массивов

Для реконструкции эпитопов целевой молекулы синтезировали библиотеку

пептидов (20-меров с перекрытием по 18 аминокислотам), покрывающих последовательность тау 441. Для этого получили модифицированную аминогруппами полипропиленовую подложку путем прививки с применением композиции гидрофильного полимера собственной разработки с последующей реакцией с трет-бутилоксикарбонил-гексаметилендиамином (BocHMDA) с применением дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBT) и последующим отщеплением Boc-групп с помощью трифторуксусной кислоты (TFA). Для синтеза пептидов на модифицированной аминогруппами полипропиленовой подложке применяли стандартный Fmoc-пептидный синтез на специально модифицированных для этого автоматизированных рабочих станциях дозирования жидкостей JANUS (Perkin Elmer). Синтез структурных миметиков проводили с применением технологии химически связанных пептидов на каркасах (CLIPS) разработки Pepscan (Timmerman P, Puijk WC, Meloen RH (2007) Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS technology. J Mol Recognit 20: 283-299. 10.1002/jmr.846 [doi]). Технология CLIPS позволяет структурировать пептиды в одиночные петли, двойные петли, тройные петли, листоподобные складки, спиралеподобные складки и их комбинации. Шаблоны CLIPS связываются с цистеиновыми остатками. Боковые цепи множества цистеинов в пептидах связываются с одним или двумя шаблонами CLIPS. Например, 0,5 мМ раствора P2 CLIPS (2,6-бис(бромометил)пиридина) растворяют в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,8) / ацетонитриле (1 : 3 (об./об.)). Этот раствор добавляют на пептидные массивы. Шаблон CLIPS связывается с боковыми цепями двух цистеинов, присутствующих в связанных на твердой фазе пептидах пептидных массивов (455-луночные планшеты с лунками по 3 мкл). Пептидные массивы осторожно встряхивали в растворе в течение от 30 до 60 минут, при этом они были полностью покрыты раствором. Затем пептидные массивы тщательно промывали в избытке H₂O и разрушали ультразвуком в буфере, содержащем 1% SDS/0,1% бета-меркаптоэтанола в PBS (pH 7,2) при температуре 70 °С в течение 30 минут, с последующей ультразвуковой обработкой в H₂O в течение еще 45 минут. Несущие пептиды массивы T3 CLIPS получали аналогичным образом, но теперь с тремя цистеинами.

ИФА-скрининг

Связывание антител (экспрессируемых рекомбинантным образом как IgG2a) с каждым из синтезированных пептидов проверяли методом ИФА на основе Pepscan. Пептидные массивы инкубировали с раствором первичных антител (в течение ночи при температуре 4 °С). После промывки пептидные массивы инкубировали с раствором соответствующего конъюгата антитела с пероксидазой (SBA) в разбавлении 1/1000 в течение одного часа при температуре 25 °С. После промывки добавляли субстрат пероксидазы, 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолин сульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3-процентного H₂O₂. Через час измеряли образовавшуюся окраску. Окраску определяли количественно с помощью ПЗС камеры (CCD) и системы обработки изображений.

Результаты

Представленные на Фиг. 7 данные показывают связывание PT82 с рядом пептидов начиная с остатка 103 и до остатка 140 в последовательности тау 441. Для этих антител связывания с другими тау-пептидами не наблюдали. Подробное картирование показало, что PT82 связывается с пептидами с общим мотивом ${}_{119}\text{AGHVTQ}_{124}$ (SEQ ID NO:32).

Пример 10

Гуманизация PT82

Несколько последовательностей вариабельной области человека были выбраны для тестирования с целью поиска наилучшей комбинации гуманизированных тяжелой и легкой цепи. Выбор зародышевых линий и J-областей человека основывался исключительно на общем сходстве последовательностей с мышинным антителом в каркасной области (FR). При отборе не учитывались ни последовательности CDR, ни их длина или канонические структуры.

Используемое в HFA определение CDR описано в (Fransson J, et al. *J. Mol. Biol.* 2010; 398:214-231) и соответствует определению Мартин (Abhinandan KR and Martin AC. *Mol. Immunol.* 2008; 45:3832-3839). Области CDR определены следующим образом (применяя схему нумерации Chothia [Chothia C, and Lesk A. *J. Mol. Biol.* 1987; 196:901-917]. В положениях каркасных областей, важность которых для спаривания областей VL/VH и конформации CDR известна, варьировали аминокислоты в бинарной библиотеке остатков для введения обратных мутаций от человека к мыши для сохранения аффинности связывания гуманизированных V-областей. Для PT82 области CDR прививали в ген зародышевой линии HV3-72*01а человека. Комбинаторная библиотека VH: человек/мышь включала положения 37: I, V; 78: V, L; 93: T, A; 94: R, G. Для легкой цепи области CDR прививали в ген KV1-9*01а человека с комбинаторной библиотекой VL: человек/мышь в положениях 4: L, M и 78: L, M.

Кроме того, ряд положений в областях VH и VL рандомизировали в библиотеке фагового дисплея для улучшения аффинности гуманизированного PT82 (таблица 6).

Таблица 6. Положения библиотеки созревания аффинности

Положение VH	Положение VL
Y32	A32
W33	A34
N35	Y49
Q50	Y55
R52	Q89
L52a	F91
S52c	S92
D53	S93
A56	Y94
R58	Y96

G95	
T96	

Библиотеки гуманизации/созревания генерировали с применением вырожденных олигонуклеотидов в перекрывающемся ПЦР. Фрагменты ДНК библиотек VH или VL затем клонировали в фагмиду pCANTO (Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; межд. публ. пат. № WO2009/085462; публ. пат. США № US2010/0021477; публ. пат. США № US2012/0108795) в комбинации с комплементарной V-областью мыши. Библиотечные лигаты очищали и трансформировали в клетки MC1061F'. Клетки выращивали в 2xYT (Carb) до достижения логарифмической фазы роста ($OD_{600 \text{ нм}} \approx 0,6$). Затем добавляли вспомогательный фаг и инкубировали культуры при температуре 37 °C в течение 30 минут. В каждую культуру добавляли канамицин и изопропилтиогалактозид до конечных концентраций 35 мкг/мл и 1 мМ соответственно и выращивали культуры в течение ночи при температуре 30 °C с встряхиванием. Фаг из бактериальной среды осаждали с применением ПЭГ/NaCl и ресуспендировали в PBS.

Для пэннинга созревания аффинности пептид Vt-тау захватывали на 50 мкл покрытых SA магнитных гранул. Концентрации антигена составляли 10 нМ для тура 1, 0,1 нМ для тура 2 и 0,1 нМ для тура 3. Гранулы 6 раз промывали PBST и один раз PBS и затем инфицировали E. coli, как описано выше. После отбора на фаговом дисплее фагмидную ДНК выделяли из инфицированных клеток MC1061F' и расщепляли рестрикционными ферментами для удаления последовательности, кодирующей рIX, а линеаризованную плазмидную ДНК вырезали и очищали от агарозных гелей. Впоследствии эта ДНК самолигировалась с ДНК-лигазой T4. Лигированную ДНК электропорировали в клетки MC1061F' и наносили на планшеты с агаром-LB (углевод/глюкоза).

Колонии от этой электропорации выбирали для ИФА-скрининга и оценки экспрессии Fab. Вкратце, 96-луночные планшеты MaxiSorp покрывали растворимым тау-белком. Колонии Fab выращивали в среде 2xYT и индуцировали экспрессию Fab изопропилтиогалактозидом. Планшеты для ИФА промывали и в каждый планшет добавляли Fab, секретированный в среду E. coli. Планшеты промывали и в планшеты ИФА добавляли анти-Fab'2:HRP (Jackson ImmunoResearch). Планшеты промывали, добавляли реагент для хемилюминесцентного детектирования и считывали планшеты по люминесценции на сканирующем спектрофотометре Perkin Elmer EnVision.

Положительные клоны секвенировали как в VH, так и в VL. Последовательности областей VH и VL перечислены в таблице 1. Уникальные последовательности клонировали в конструкции для экспрессии гена IgG для экспрессии и очистки в виде полноразмерных молекул IgG1. Конструкции IgG трансфицировали в клетки CHO-Expi и белок IgG очищали с применением смолы MabSelectSure. Затем антитела проверяли в ИФА на связывание с растворимым тау-белком с применением анти-человеческого Fc:HRP (Jackson ImmunoResearch) для определения связывания с IgG. Эти данные показаны на Фиг. 8. Гуманизация не сказалась существенно на связывании с растворимым тау-белком по сравнению со связыванием PT82 с растворимым тау-белком.

ИФА проводили, как описано для Fab, за исключением того, что антитела проверяли при пяти 5-кратных разбавлениях, начиная с 5 мкг/мл, в PGS, а для определения связывания с IgG применяли анти-человеческий Fc:HRP (Jackson ImmunoResearch).

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PHF-тау, содержащее переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую определяющую комплементарность область 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую определяющую комплементарность область 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1 с SEQ ID NO:1; HCDR2 с SEQ ID NO:2 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:4; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

(b) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:8 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:9; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

(c) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:10 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

(d) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:12 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6;

(e) HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:13 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6; или

(f) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1 с SEQ ID NO:7; HCDR2 с SEQ ID NO:14 и HCDR3 с SEQ ID NO:3 и LCDR1 с SEQ ID NO:11; LCDR2 с SEQ ID NO:5; и LCDR3 с SEQ ID NO:6.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 16;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 18;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:19, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 20;

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 22;

(e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 20; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 95% совпадает с SEQ ID NO: 25.

3. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, содержащие:

(a) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22;

(e) вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO:23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 25.

4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3.

5. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 4.

6. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 4 или вектор по п. 5.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Способ снижения патологического агрегирования тау-белка или распространения таупатии у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 7.

9. Способ лечения таупатии у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 7.

10. Способ лечения таупатии у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 7, причем таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (включая семейную болезнь Альцгеймера и спорадическую болезнь Альцгеймера), лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего супрануклеарного пареза зрения, кортико-базальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с

преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофической боковой склероз - паркинсонизм - деменция, синдрома Дауна, синдрома Герстманна - Штреусслера - Шейнкера, синдрома Галлервордена - Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейтцфельда - Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна - Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, не-Гуамовой болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и деменции боксеров.

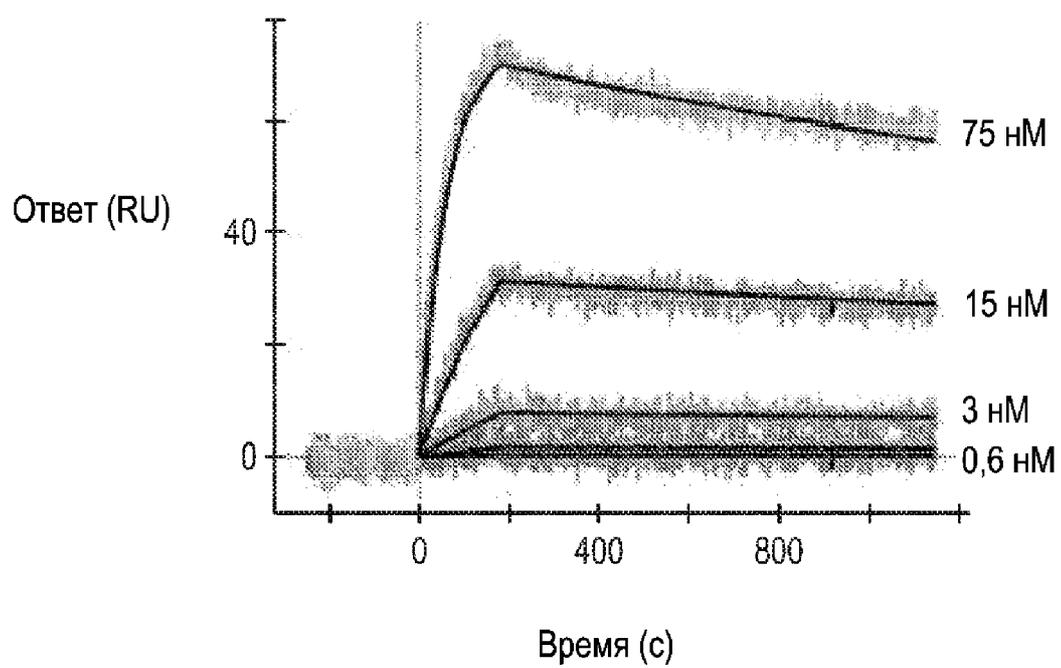
11. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-3, включающий культивацию клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент в условиях для получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

12. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, включающий объединение антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

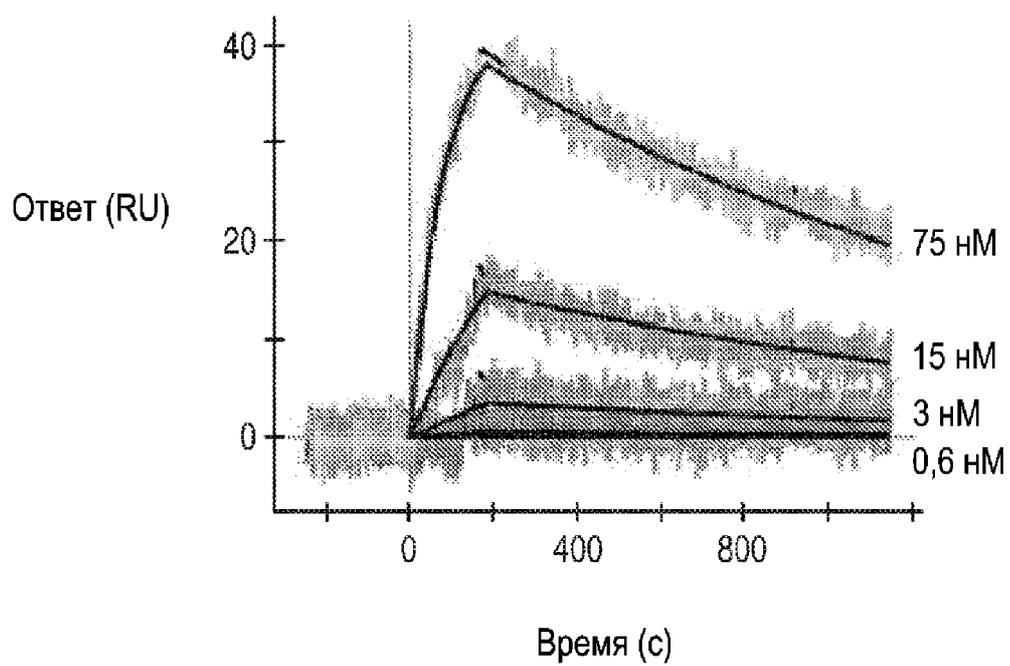
13. Способ обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у пациента биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-3 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау во взятой у пациента пробе.

14. Способ по п. 13, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, мочи или спинномозговой жидкости.

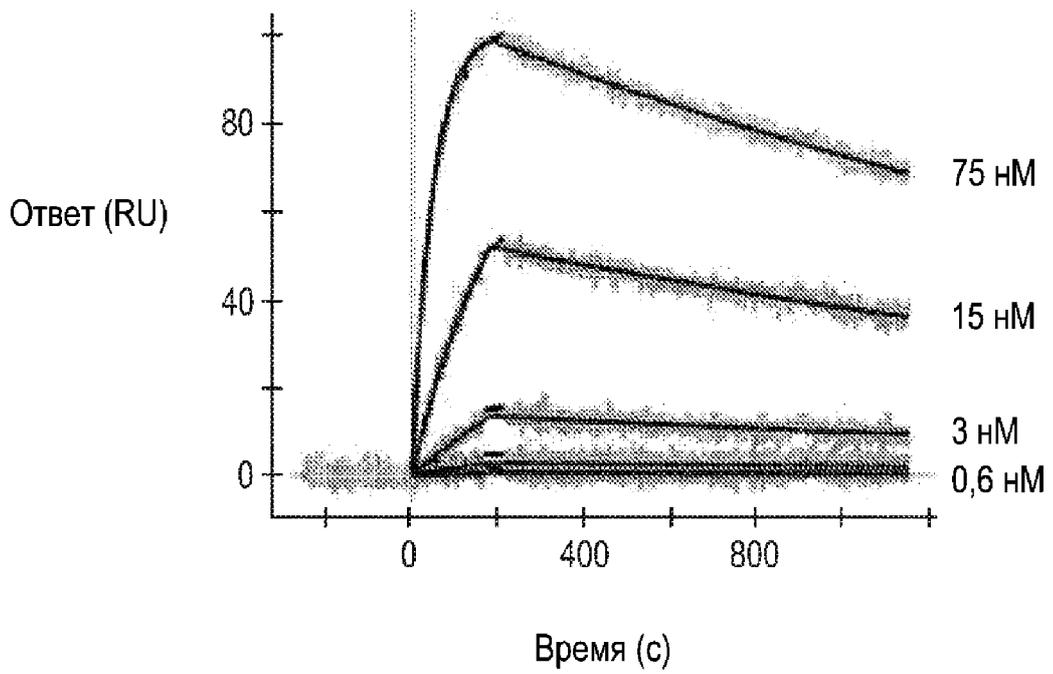
По доверенности

ФИГ. 1А

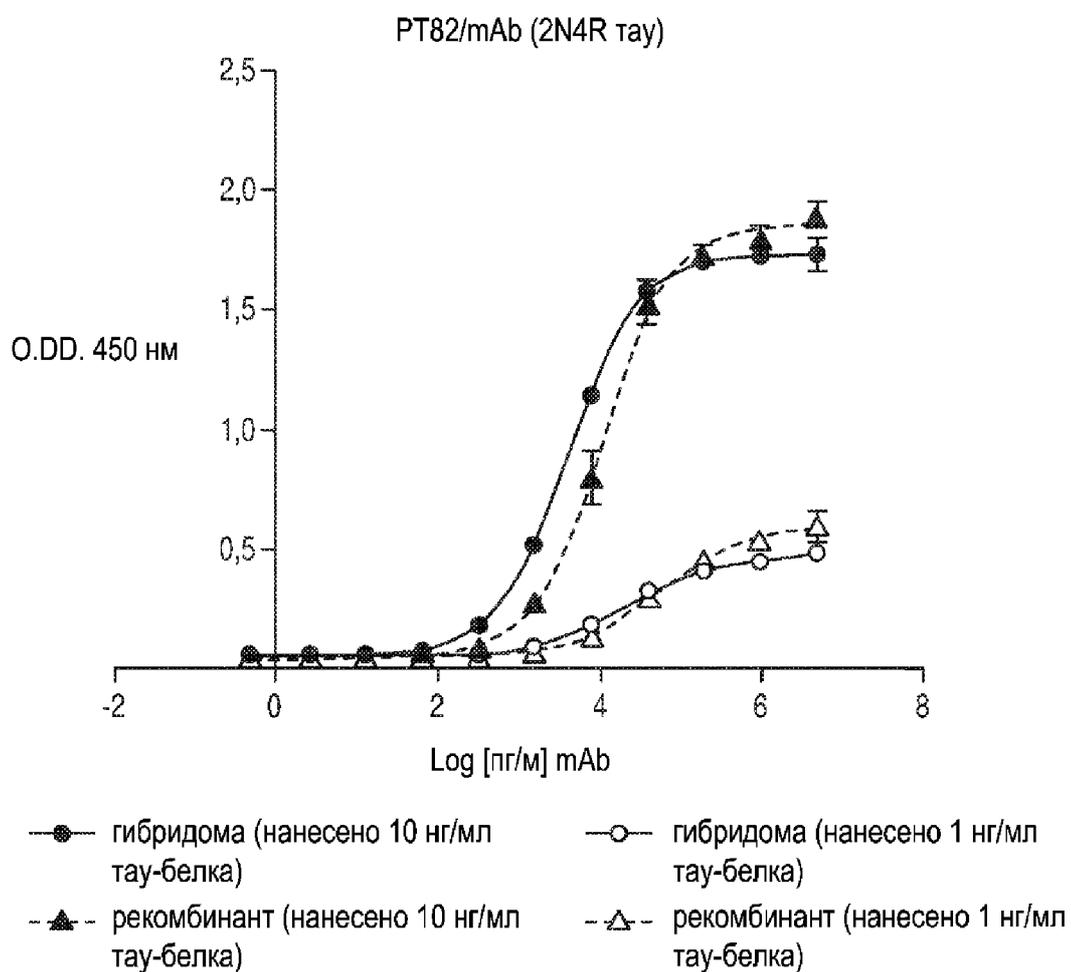
ФИГ. 1В

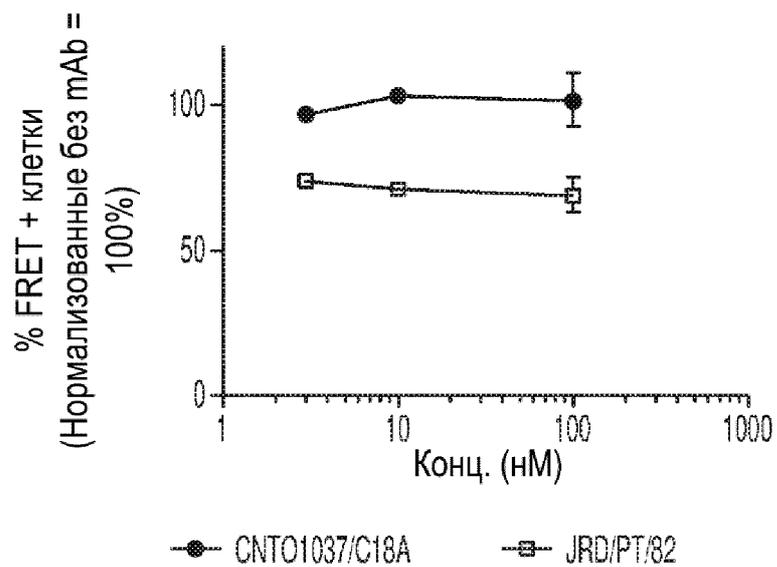


ФИГ. 1С



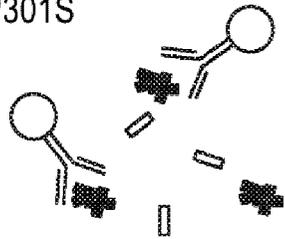
ФИГ. 2



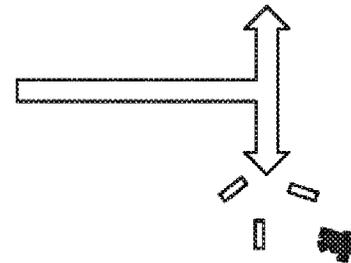
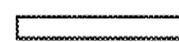
ФИГ. 3А**ФИГ. 3В**

ФИГ. 4А

Антитела, связанные с магнитными гранулами + общий гомогенат из пула БА или из спинного мозга Р301S



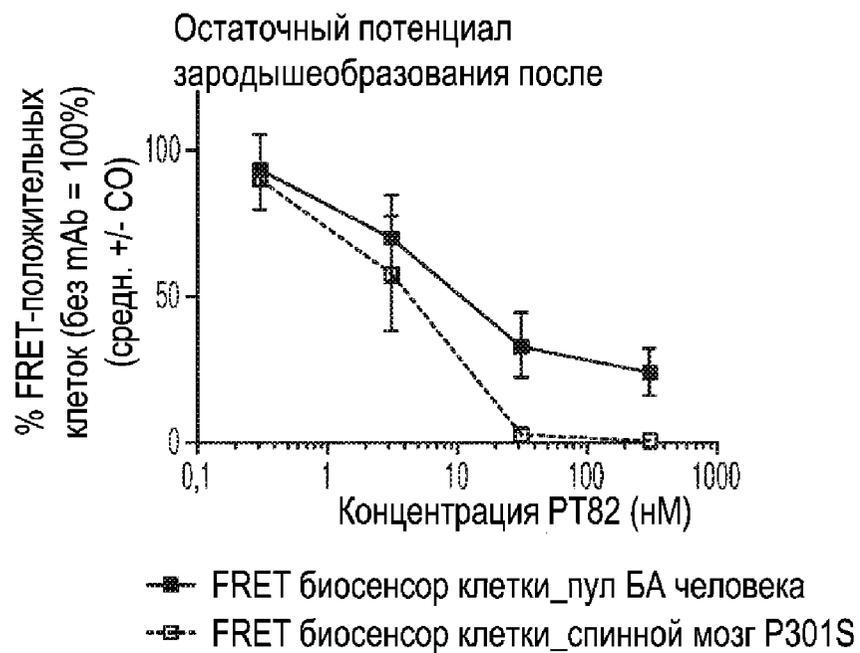
Доля иммунодеплеции



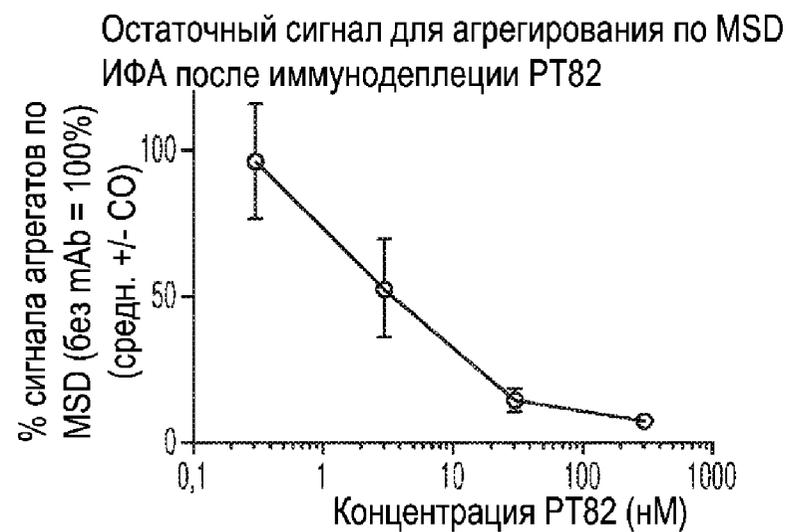
Потенциал ззародышеобразования % FRET-положительных клеток

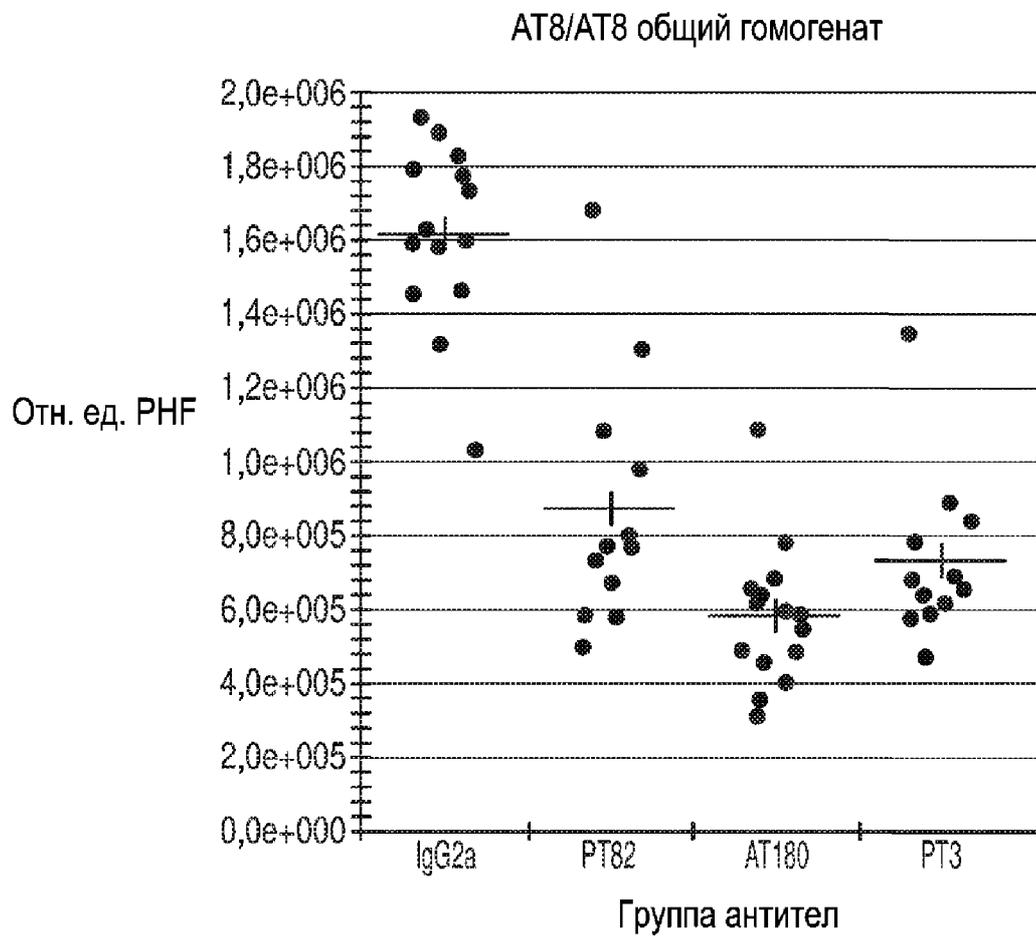
Агрегирование по MSD ИФА Биохимия

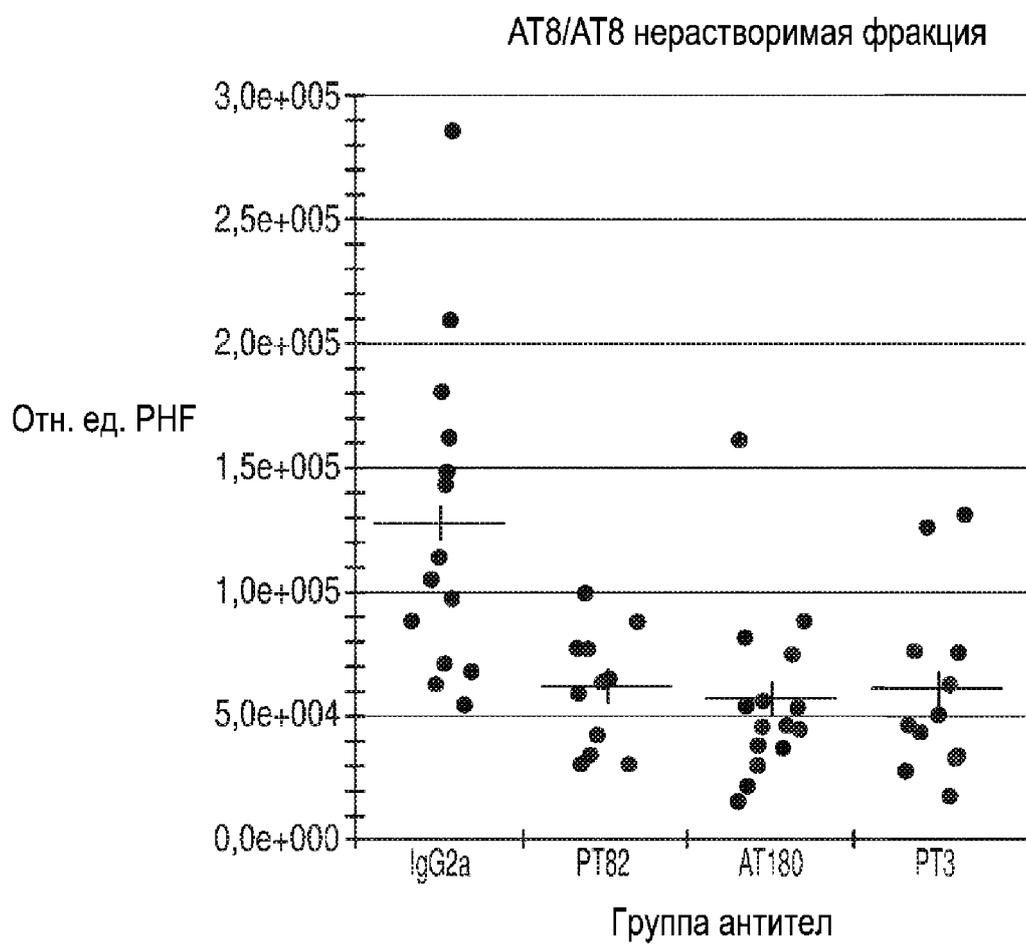
ФИГ. 4В



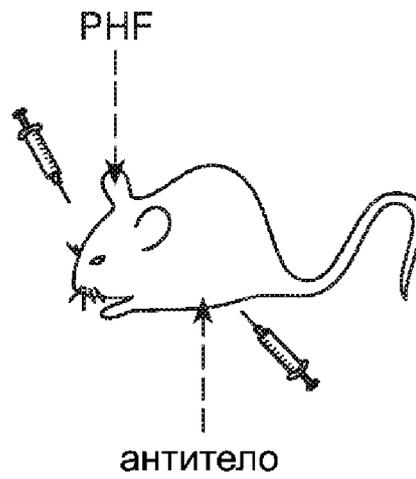
ФИГ. 4С



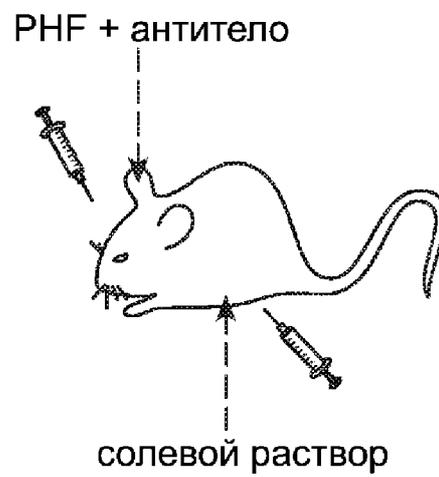
ФИГ. 5А

ФИГ. 5В

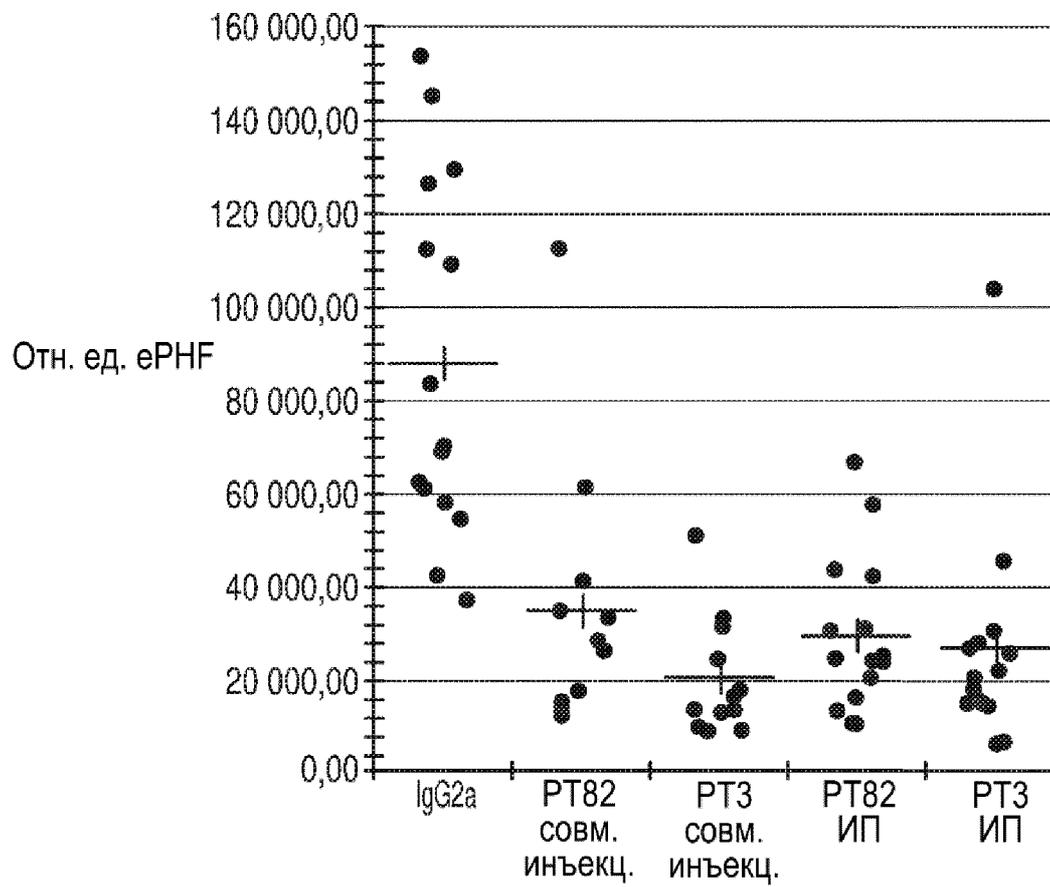
ФИГ. 6А

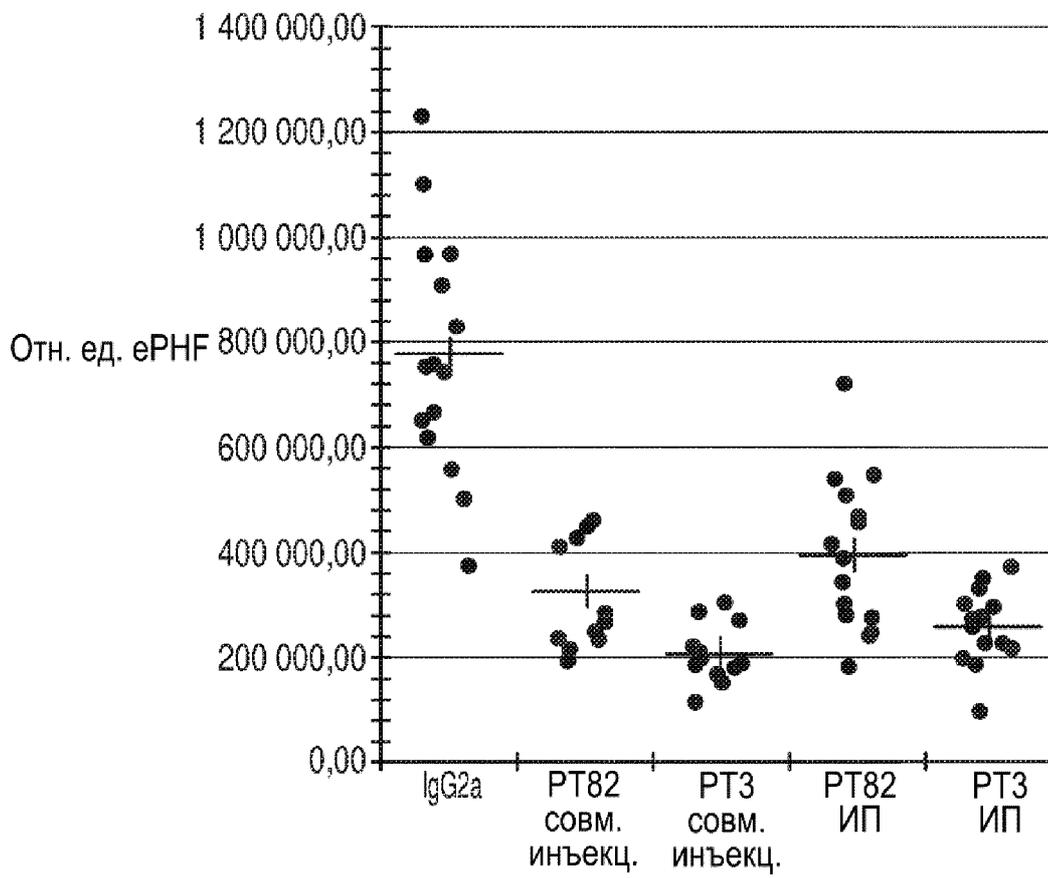


ФИГ. 6В



ФИГ. 6С



ФИГ. 6D

ФИГ. 8