



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.09

(21) Номер заявки
201592203

(22) Дата подачи заявки
2014.06.09

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ УРОВНЕЙ Аβ₄₀ И/ИЛИ Аβ₄₂ В НЕРВНОЙ КЛЕТКЕ И/ИЛИ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

(31) 61/833,355; PCT/US2013/055203;
14/092,539

(32) 2013.06.10; 2013.08.15; 2013.11.27

(33) US

(43) 2016.05.31

(86) PCT/US2014/041553

(87) WO 2014/200921 2014.12.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЙПИЕРИАН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Грисволд-Преннер Ирэн, Стаглиано
Нэнси Е., Дан Ву Цао, Хуссейн Сами,
Брайт Джессика Мишель (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) US-A1-2012142602
WO-A2-2014028777
WO-A2-2014031694

IRENE GRISWOLD-PRENNER, S. HUSSAIN, T. BYUN, J. BRIGHT, S. TOM, B. COOPER, N. STAGLIANO, G. PARRY, S. WRIGHT: "Effects of a Tau therapeutic antibody on the ISF/CSF levels of secreted Tau in the P301L mouse model", NEUROSCIENCE, 2013, SAN DIEGO, CALIFORNIA, 9-13 NOVEMBER 2013, [Online], no. Poster #598.07, 9 November 2013 (2013-11-09), 13 November 2013 (2013-11-13), XP002728352

Makoto Higuchi, John Q. Trojanowski And Virginia M.-Y. Lee: "Tau Protein And Tauopathy (Chapter 94)", In: "Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress", 1 January 2002 (2002-01-01), Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, XP055134277, pages 1339-1354

WO-A1-9620218

SARAH M. WARD ET AL.: "Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease", BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 8, no. 4, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 663-671, XP055087302, ISSN: 0300-5127, DOI: 10.1073/pnas.242720499

N. KFOURY ET AL.: "Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 23, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 19440-19451, XP055087124, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.346072

X. CHAI ET AL.: "Passive Immunization with Anti-Tau Antibodies in Two Transgenic Models: REDUCTION OF TAU PATHOLOGY AND DELAY OF DISEASE PROGRESSION", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 39, 30 September 2011 (2011-09-30), pages 34457-34467, XP055087176, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.229633

D. TERWEL ET AL.: "Changed Conformation of Mutant Tau-P301L Underlies the Moribund Tauopathy, Absent in Progressive, Nonlethal Axonopathy of Tau-4R/2N Transgenic Mice", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 5, 27 October 2004 (2004-10-27), pages 3963-3973, XP055133928, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M409876200

YOSHIYAMA YASUMASA ET AL.: "Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration", JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY & PSYCHIATRY, BMJ PUBLISHING GROUP, GB, vol. 84, no. 7, 20 October 2012 (2012-10-20), pages 784-795, XP009179394, ISSN: 0022-3050, DOI: 10.1136/JNNP-2012-303144 [retrieved on 2012-10-20]

(57) В изобретении предусматривается способ снижения уровней Аβ₄₀ и/или Аβ₄₂ в нервной клетке и/или во внеклеточной жидкости субъекта, являющегося человеком, при этом способ включает введение субъекту, являющемуся человеком гуманизованного антитела к Тау-полипептиду, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида.

Заявка на данное изобретение претендует на положительный эффект заявки США на патент № 14/092539, поданной 27 ноября 2013 г., международной заявки № PCT/US2013/055203, поданной 15 августа 2013 г., и предварительной заявки США на патент № 61/83,355, поданной 10 июня 2013 г., каждая из которых полностью включена в данный документ посредством отсылки.

Введение

Ассоциированный с микротрубочками Тау-белок содержится в больших количествах в центральной нервной системе и в основном синтезируется нейронами. Основная функция Тау-белка состоит в стабилизации микротрубочек. В мозге взрослого человека содержатся шесть изоформ Тау-белка, эти изоформы являются продуктами альтернативного сплайсинга индивидуального гена.

Таупатии относятся к классу нейродегенеративных заболеваний, возникающих в результате патологической агрегации Тау-белка в так называемых нейрофибриллярных узлах (NFT) в мозге. Некоторые примеры таупатий включают лобно-височную деменцию (FTD), болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию и лобно-височную лобарную дегенерацию. В уровне техники существует необходимость в способах лечения таупатий и в реагентах, которые пригодны для применения при осуществлении таких способов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к Тау-белку. Данное изобретение предусматривает также антитела к Тау-белку и композиции, содержащие их, для использования при осуществлении таких способов.

Характерные признаки.

Настоящее изобретение относится к способу снижения уровней $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в нервной клетке и/или во внеклеточной жидкости субъекта, являющегося человеком, при этом способ включает введение субъекту, являющемуся человеком гуманизованного антитела к Тау-полипептиду, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. Согласно некоторым вариантам антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 41. Согласно некоторым вариантам введение является внутривенным введением. Согласно некоторым вариантам введение является интратекальным введением. Согласно некоторым вариантам эпитоп находится в Тау-полипептиде, содержащем аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 48 по меньшей мере на 95% (eTau4). Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизованное антитело, это гуманизованное антитело включает область тяжелой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам, когда антитело представляет собой гуманизованное антитело, это гуманизованное антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. Согласно некоторым вариантам внеклеточная жидкость является цереброспинальной жидкостью, интерстициальной жидкостью, кровью или фракцией крови (например, фракцией крови, такой как плазма или сыворотка). Согласно некоторым вариантам антитело включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам заболевание, подвергающееся лечению, представляет собой болезнь Альцгеймера.

Согласно некоторым вариантам антитело связывает линейный эпитоп. Согласно некоторым вариантам эпитоп находится в пределах Тау-полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 48 по меньшей мере на 95% (eTau4). Настоящее изобретение предусматривает выделенное гуманизованное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. В некоторых случаях эпитоп не содержит фосфорилированной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп не содержит нитрованной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или и фосфорилированную аминокислоту, и нитрованную аминокислоту.

Данное изобретение предусматривает выделенное антитело, содержащее каркасную область гуманизованной легкой цепи и каркасную область гуманизованной тяжелой цепи, при этом выделенное антитело при связывании с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокис-

лотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи находятся в разных полипептидах. В некоторых случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи находятся в одном полипептиде. В некоторых случаях область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых случаях область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG4. В некоторых случаях шарнирная область содержит замену S241P. См., например, Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагменты Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. В некоторых случаях антитело содержит ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например, полиэтиленгликоль. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что способствует переносу (транспорту) через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. В некоторых случаях область каркасного участка гуманизированной легкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, что показано в табл. 3. В некоторых случаях область каркасного участка гуманизированной тяжелой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 аминокислотных замен, что показано в табл. 2.

Настоящее антитело предусматривает выделенное антитело, причем антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab', и при этом антитело при связывании с эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной легкой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной легкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных замен, показанных в табл. 3. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжелой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной тяжелой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в табл. 2.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, при этом такое выделенное антитело содержит константную область легкой цепи человека и константную область тяжелой цепи человека и выделенное антитело при связывании эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую а) антитело к Тау-белку по данному изобретению и б) фармацевтически приемлемый эксципиент.

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую а) антитело, которое специфически связывается с эпитопом в N-концевой области Тау, при этом антитело включает (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, пригодный для введения человеку, при этом композиция не содержит эндотоксинов. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной легкой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной легкой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных замен, показанных в табл. 3. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжелой цепи. В некоторых случаях каркасный участок гуманизированной тяжелой

лой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в табл. 2.

В некоторых случаях антитело является инкапсулированным в липосому. В некоторых случаях антитело содержится вместе с агентом, который облегчает перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что способствует переносу через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'.

Настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к Тау-белку по изобретению, при этом нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом транскрипционного контроля, который проявляет активность в эукариотной клетке. Настоящее изобретение предусматривает *in vitro* клетку-хозяина, генетически модифицированную рекомбинантным экспрессионным вектором согласно данному изобретению.

Настоящее изобретение предусматривает стерильный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по изобретению. В некоторых случаях контейнер является шприцем.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения таупатии у субъекта, который включает введение субъекту антитела к Тау-белку по изобретению или фармацевтической композиции, которая его содержит.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения таупатии у субъекта, который включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей а) антитело, которое при связывании с эпитопом в N-концевом участке Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает i) гипервариабельные участки, распознающие антиген (CDRs), легкой цепи антитела, показанного на фиг. 1B; и CDRs тяжелой цепи антитела, показанного на фиг. 2A; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения композиции человеку. В некоторых случаях антитело включает (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной легкой цепи. В некоторых случаях выделенное антитело включает каркасный участок гуманизированной тяжелой цепи. В некоторых случаях антитело инкапсулировано в липосому. В некоторых случаях антитело содержится вместе с агентом, который облегчает перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело связано, непосредственно или через линкер, с молекулой носителя, пептида или белка, что промотирует перенос через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях антитело представляет собой фрагмент Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'.

Согласно некоторым вариантам антитело вводится внутривенно. Согласно некоторым вариантам антитело вводится интрастекально.

В некоторых случаях введение субъекту антитела к Тау приводит к изменению одного или более параметров: а) количества свободного внеклеточного Тау в тканях мозга; б) количества свободного внеклеточного Тау в интерстициальной жидкости (ISF); в) количества свободного внеклеточного Тау в цереброспинальной жидкости (CSF) (ликворе); д) передачи Тау от нейрона к нейрону; е) количества агрегатов интранейронных сплетений тау; ф) степени активации микроглиальных клеток и/или астроцитов; г) количества фосфорилированного или гиперфосфорилированного Тау; h) количества тотального Тау или свободного Тау в ISF или CSF; и) количества внутриклеточных N-концевых фрагментов Тау; j) гиперактивности нейронов; к) количества Aβ₄₀ и/или Aβ₄₂ в CSF; l) объема бляшек Aβ; m) секреции Aβ₄₀ и/или Aβ₄₂ нейронами; n) активности промотора предшественника амилоида (APP); о) уровня мРНК APP и/или белка; p) активности бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояния активации Aβ-индуцированного сигнального пути; r) количества внутриклеточного тотального Тау или свободного Тау; s) количества конъюгата антитело к тау-связанный Тау в ISF или CSF; и t) количества внутриклеточного конъюгата антитело к тау-связанный Тау.

В некоторых случаях способ лечения таупатии у субъекта по изобретению включает также введение по меньшей мере одного дополнительного агента, который также применяется для лечения таупатии.

Настоящее изобретение предусматривает также способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта, включающий а) определение первого уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первый момент времени; б) определение второго уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй момент времени; и с) сравнение величины второго уровня Тау с величиной первого уровня Тау, при этом указанное определение включает i) контактирование биологического образца с антителом по любому из пп. 1, 5, 16 и 21 и ii) количественное определение связывания антитела к Тау-полипептиду, содержащемуся в образце. В некоторых случаях биологический

образец является цереброспинальной жидкостью, кровью, плазмой, сывороткой, мочой или слюной. В некоторых случаях количество Тау-полипептида представляет собой количество тотального (общего) Тау-полипептида. В некоторых случаях количество Тау-полипептида является количеством N-концевого фрагмента полноразмерного Тау-полипептида. В некоторых случаях первый момент времени является моментом времени перед началом лечения и второй момент времени является моментом после начала лечения.

Настоящее изобретение предусматривает способ определения Тау-полипептида в организме живого субъекта *in vivo*, который включает а) введение субъекту антитела по любому из пп.1, 5, 16 и 21; и б) определение степени связывания антитела с Тау-полипептидом в ткани мозга у субъекта с использованием метода визуализации изображения. В некоторых случаях антитело содержит контрастный агент, пригодный для применения при осуществлении метода визуализации. В некоторых случаях метод визуализации представляет собой магнитно-резонансную томографию или позитронно-эмиссионную томографию.

Настоящее изобретение предусматривает *in vitro* способ определения Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта, который включает а) контактирование биологического образца с антителом, конкурирующим при связывании с эпитопом в пределах N-концевой области Тау с антителом, которое включает i) участки, распознающие антиген, гипервариабельные участки (CDRs) легкой цепи антитела, изображенного на фиг. 1B; CDRs тяжелой цепи антитела, изображенного на фиг. 1A; или ii) CDRs легкой цепи антитела, изображенного на фиг. 2B; и CDRs тяжелой цепи антитела, изображенного на фиг. 2A; и б) определение степени связывания антитела с Тау-полипептидом, содержащимся в образце. В некоторых случаях биологический образец является цереброспинальной жидкостью, кровью, плазмой, сывороткой, мочой или слюной. В некоторых случаях предполагают наличие таупатии у субъекта, или таупатия диагностирована, или субъект имеет генетическую предрасположенность к возникновению таупатии. В некоторых случаях указанный метод является количественным. В некоторых случаях определенный Тау-полипептид является тотальным Тау-полипептидом. В некоторых случаях определенный Тау-полипептид представляет собой N-концевой фрагмент полноразмерного Тау-полипептида.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A представлены аминокислотные последовательности антитела IPN001 V_H (фиг. 1A) и V_L (фиг. 1B). Гипервариабельные участки, участки, распознающие антиген (CDRs), выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фиг. 2A и 2B показаны аминокислотные последовательности антитела IPN002 V_H (фиг. 2A) и V_L (фиг. 2B). Гипервариабельные участки (CDRs), выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Фиг. 3A-D показывают влияние антитела к Тау IPN002 на тау-опосредованную деполаризацию мембраны в кортикальных нейронах.

Фиг. 4A-C иллюстрируют аффинное выделение Тау-белка из цереброспинальной жидкости (CSF).

На фиг. 5 показан количественный анализ CSF и кондиционированной среде (CM) в образцах до и после выделения связанного Тау.

На фиг. 6A-D представлены аминокислотные последовательности полноразмерного Тау человека.

На фиг. 7 отражено определение тау-фрагментов в кондиционированной среде, в интерстициальной жидкости (ISF) из P301L Тау мышей, и в CSF, полученной от пациентов с PSP и AD.

На фиг. 8A-D показана индукция гиперактивности кортикальных нейронов фрагментом внеклеточного Тау (eТау) (фиг. 8A-C) и снижение eТау-индуцированной гиперактивности нейронов при применении антитела к Тау IPN001.

На фиг. 9 показаны аминокислотная последовательность варианта 1 V_H гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 10 показаны аминокислотная последовательность варианта 2 V_H гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 11 показаны аминокислотная последовательность варианта 3 V_H гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 12 показаны аминокислотная последовательность варианта 4 V_H гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 13 показаны аминокислотная последовательность варианта 1 V_K гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 14 показаны аминокислотная последовательность варианта 2 V_K гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 15 показаны аминокислотная последовательность варианта 3 V_K гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 16 показаны аминокислотная последовательность варианта 4 V_K гуманизованного антитела IPN002 и нуклеотидная последовательность, кодирующая эту аминокислотную последовательность.

На фиг. 17 приведена табл. 4, которая показывает связывающие свойства вариантов гуманизованного антитела IPN-002 по отношению к eТау-белкам.

На фиг. 18 приведена табл. 5, которая показывает связывающие свойства вариантов гуманизованного антитела IPN-002 к тау-383.

Фиг. 19А и 19В отражают свойства вариантов гуманизованного антитела IPN002. На фиг. 19А показана степень связывания вариантов гуманизованного антитела IPN-002 с Тау, содержащимся в кондиционированной среде iPSC-CN; в лизатах iPSC-CN; в лизатах мозга при наличии AD; и с тау-P301L в лизатах коры головного мозга мыши; и в лизатах мозга яванского макака. Фиг. 19В показывает ингибирование еТау-индуцированной гиперактивности нейронов при применении вариантов гуманизованного антитела IPN002.

Фиг. 20 отражает аминокислотные последовательности фрагментов еТау, выравненные с аминокислотной последовательностью фетального Тау.

На фиг. 21А-С показана реакция в виде пролиферации на введение гуманизованного антитела к Тау (фиг. 21А), химерного антитела (фиг. 21В) и гуманизованного антитела А33 (фиг. 21С).

На фиг. 22 показано влияние IPN002 на уровни фосфорилированного Тау *in vivo*.

На фиг. 23 показано снижение уровня свободного Тау и уровня общего Тау в интерстициальной жидкости (ISF) после лечения с применением антитела IPN002.

На фиг. 24 показано снижение уровня свободного Тау в цереброспинальной жидкости (CSF) после лечения с применением антитела IPN002.

Фиг. 25 отражает снижение еТау-индуцированной гиперактивности нейронов при применении IPN002.

Фиг. 26 показывает наличие фрагментов Тау в CSF субъектов с вероятной хронической травматической энцефалопатией.

Фиг. 27 показывает связывание гуманизованного варианта IPN002 с синтетическими тау-пептидами при проведении твердофазного метода анализа.

Фиг. 28 показывает связывание гуманизованного варианта IPN002 с синтетическими тау-пептидами при проведении жидкофазного метода анализа.

Фиг. 29 показывает связывание гуманизованного варианта IPN002 с рекомбинантным Тау и с пептидом PAD.

Фиг. 30 показывает конкуренцию небитинилированных форм синтетических тау-пептидов и битинилированных форм синтетических тау-пептидов при связывании с гуманизованным вариантом антитела IPN002.

Фиг. 31 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на хватательный рефлекс в мышинной модели P310L.

Фиг. 32 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на среднюю латентность при проведении теста "прогулка по перекладине" в мышинной модели P310L.

Фиг. 33 отражает влияние введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002 на уровень свободного Тау (тау, не связанного с антителом к Тау) в образцах CSF в мышинной модели P310L.

На фиг. 34 показано ингибирование антителом еТау-индуцированной гипервозбудимости нейронов.

Фиг. 35 показывает влияние введения полноразмерного, PHF1-реактивного Тау или еТау1а на *in vitro* гипервозбудимость кортикальных нейронов.

На фиг. 36 графически показано влияние введения полноразмерного, PHF1-реактивного Тау или еТау1а на *in vitro* гипервозбудимость кортикальных нейронов.

На фиг. 37 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни A β ₄₀ (левая панель) или A β ₄₂ (правая панель), секретированных из кортикальных нейронов.

На фиг. 38 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни A β ₄₀, секретированного из первичных кортикальных нейронов.

На фиг. 39 показано влияние введения контрольного IgG, ингибитора BACE или IPN002 на уровни A β ₄₂, секретированного из первичных кортикальных нейронов.

На фиг. 40 показаны результаты картирования эпитопа гуманизованного варианта антитела IPN002 (hu-IPN002).

На фиг. 41 представлен анализ определения различных Тау-полипептидов в CSF.

На фиг. 42 показано связывание в CSF Тау антителами IPN002, PHF1 или поликлонального антитела, которое связывает линейный эпитоп в С-концевой части Тау (линейного эпитопа pAb-Ta τ).

На фиг. 43 показаны результаты лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровни общего Тау в CSF.

Фиг. 44А-Н отражают влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на содержание фосфо-тау AT8 в различных участках мозга и тканях.

Фиг. 45А-Е отражают влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровни фосфорилированного Тау в различных участках мозга и тканях.

На фиг. 46 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на гистологию фосфо-тау AT8 в задней части мозга.

На фиг. 47 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на гисто-

логию фосфо-тау AT100 в задней части мозга.

На фиг. 48А и 48В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень белка GFAP в гомогенате гиппокампа и в кортикальном гомогенате.

На фиг. 49А и 49В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень белка Iba1 в гомогенате гиппокампа и в кортикальном гомогенате.

На фиг. 50А и 50В показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на уровень A β ₄₀ гомогенате гиппокампа и в кортикальной фракции S1.

На фиг. 51 показано влияние лечения мышей P301L контрольным IgG, PHF1 или IPN002 на количество мышей, способных к проведению "прогулки по перекладине".

Фиг. 52 показывает связывание hu-IPN002 с различными тау-пептидами.

Фиг. 53 показывает связывание различных биотинилированных Тау-пептидов с hu-IPN002.

На фиг. 54А и 54В схематически показано проведение анализов Тау, не связанного с IPN002 (свободного Тау) (фиг. 54А); и Тау, связанного с IPN002 (связанного тау) (фиг. 54В).

Фиг. 55А и 55В показывают влияние Тау-полипептидов на уровень A β ₄₀ (фиг. 55А) и A β ₄₂ (фиг. 55В) в среде, кондиционированной фетальными нейронами человека (HFNs).

Фиг. 56А и 56В показывают влияние введения антител к Тау на уровень A β ₄₀ (фиг. 56А) и A β ₄₂ (фиг. 56В) в среде, кондиционированной HFNs.

Фиг. 57А и 57В показывают влияние введения антител к Тау на уровень A β ₄₀ (фиг. 57А) и A β ₄₂ (фиг. 57В) в среде, кондиционированной HFNs.

Фиг. 58А и 58В показывают влияние введения антител к Тау на уровень A β ₄₀ (фиг. 57А) и A β ₄₂ (фиг. 57В) в среде, кондиционированной HFNs в течение 5 дн. (d5), 10 дн. (d10), 15 дн. (d15) и 20 дн. (d20).

Фиг. 59 показывает схематически области Тау, с которыми связываются различные антитела.

Фиг. 60 показывает влияние гуманизированного варианта антитела IPN002 на уровень A β в цереброспинальной жидкости нечеловеческих приматов.

На фиг. 61 приведена аминокислотная последовательность Тау 2N4R, выравненная с eТау4.

Определения

Термины "антитела" и "иммуноглобулин" включают антитела или иммуноглобулины любого типа, фрагменты антител, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном, включая, но без ограничения, фрагменты Fab, Fv, scFv и Fd, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела и белки слияния, содержащие антигенсвязывающую часть антитела и белок, не являющийся антителом. Антитела могут быть детектируемо мечеными, например, радиоизотопом, ферментом, который генерирует детектируемый продукт, флуоресцентным белком и т.п. Антитела могут быть также конъюгированы с другими молекулами, такими как члены пар специфического связывания, например, биотин (член пары специфического связывания биотин-авидин) и т.п. Антитела также могут быть связаны с твердой подложкой, включая, но без ограничения, полистирольные пластины или гранулы, и т.п. Этим термином охвачены также Fab', Fv, F(ab')₂ и/или другие фрагменты антител, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном, и моноклональные антитела. Антитело может быть одновалентным или бивалентным.

Термин "гуманизированный иммуноглобулин", используемый в данном документе, относится к иммуноглобулину, содержащему части иммуноглобулинов различного происхождения, при этом по меньшей мере одна часть включает аминокислотные последовательности человеческого происхождения. Например, гуманизированное антитело может включать части, полученные из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения с требуемой специфичностью, такого как мышинный иммуноглобулин, и последовательностей иммуноглобулина человеческого происхождения (например, химерного иммуноглобулина), соединенные вместе обычными химическими методами (например, методами синтеза) или полученные в виде полипептида с перекрывающимися участками с использованием методов генной инженерии (например, ДНК, кодирующая белковые части химерного антитела, может быть экспрессирована для получения цепи полипептида с перекрывающимися участками). Другим примером гуманизированного иммуноглобулина является иммуноглобулин, содержащий одну или более цепей иммуноглобулина, включающих CDR, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, и каркасную область из легкой и/или тяжелой цепей человеческого происхождения (например, CDR-привитые антитела с изменениями в каркасной области или без них). Химерные или CDR-привитые одноцепочечные антитела также охвачены данным термином "гуманизированный иммуноглобулин". См., например, Cabilly et al., патент США № 4816567; Cabilly et al., европейский патент № 0125023 B1; Boss et al., патент США № 4816397; Boss et al., европейский патент № 0120694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., европейский патент № 0194276 B1; Winter, патент США № 5225539; Winter, европейский патент № 0239400 B1; Padlan, E.A. et al., европейская заявка на патент № 0519596 A1. См. также Ladner et al., патент США № 4946778; Huston, патент США № 5476786; и Bird, R.E. et al., Science, 242:423-426 (1988)), где рассматриваются одноцепочечные антитела.

Например, гуманизированные иммуноглобулины могут быть получены с использованием синтети-

ческих и/или рекомбинантных нуклеиновых кислот для получения генов (например, кДНК), кодирующих желательную гуманизованную цепь. Например, последовательности нуклеиновых кислот (например, ДНК), кодирующие гуманизированные переменные участки, могут быть созданы с применением методов мутагенеза с помощью ПЦР для изменения последовательностей ДНК, кодирующих человеческую или гуманизованную цепь, такую как матричная цепь ДНК из ранее гуманизованного переменного участка (см., например, Kamman, M., et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:5404 (1989)); Sato, K., et al., *Cancer Research*, 53:851-856 (1993); Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9):2471-2476 (1991); и Lewis, A.P. and J.S. Crowe, *Gene*, 101:297-302 (1991)). Используя эти или другие подходящие методы, можно легко получить варианты антитела. Например, клонированные переменные участки могут быть мутагенезированы, и могут быть выбраны последовательности, кодирующие варианты с желательной специфичностью (например, из библиотеки фагов; см. например, Krebber et al., патент США № 5514548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, опубликованные 1 апреля 1993 г.).

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, например антигенсвязывающий или переменный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); одноцепочечные молекулы антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами "Fab", каждый из которых содержит антигенсвязывающий сайт, и остаточного фрагмента "Fc", обозначение которого отражает способность к легкой кристаллизации. Обработка пепсином приводит к получению фрагмента F(ab')₂, который содержит два антигенсвязывающих сайта и все еще способен к сшивке антигена.

"Fv" является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный антиген-распознающий и антигенсвязывающий сайт. Этот участок состоит из димера переменного домена одной тяжелой и одной легкой цепей в тесной нековалентной связи. Именно в этой конфигурации три CDRS каждого переменного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера V_H-V_L. Шесть CDRs вместе придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDRs специфические к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

Фрагмент "Fab" также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH₁) тяжелой цепи. Фрагменты Fab отличаются от фрагментов Fab' добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH₁ тяжелой цепи, включающего один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH обозначает в данной заявке Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов содержат свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально были получены в виде пар фрагментов Fab', которые содержат остатки цистеина шарнирной области между ними. Другие методы химического связывания фрагментов антитела также известны.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) любых позвоночных животных могут быть одного из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Имеются пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут быть далее подразделены на подклассы (изоотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

"Одноцепочечные Fv" или фрагменты "sFv" антитела включают V_H и V_L домены антитела, причем эти домены находятся в одной цепи полипептида. Согласно некоторым вариантам полипептид Fv содержит также полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который позволяет sFv образовать желаемую структуру для связывания антигена. Обзор sFv можно найти в Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к маленьким фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, эти фрагменты включают переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). При использовании линкера, который является слишком коротким для спаривания двух доменов в той же цепи, эти домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Более подробно диатела описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и в публикации Hollinger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448.

Используемый в данном документе термин "аффинность" относится к константе равновесия при обратимом связывании двух агентов (например, антитела и антигена) и выражается как константа диссоциации (K_d). Аффинность может быть по меньшей мере в один раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз

больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше или более, чем аффинность антитела к несвязанным аминокислотным последовательностям. Аффинность антитела к белку-мишени может быть, например, от примерно 100 до примерно 0.1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пМ или от примерно 100 нМ до примерно 1 фемтомолей (фМ) или более. Используемый в данном документе термин "авидность" относится к сопротивлению комплекса двух или более агентов к диссоциации после разведения. Термины "иммунореактивный" и "предпочтительно связывает" используются в данном документе как взаимозаменяемые по отношению к антителам и/или антигенсвязывающим фрагментам.

Термин "связывание" относится к прямой ассоциации между двумя молекулами, обусловленной, например, ковалентным, электростатическим, гидрофобным и ионным взаимодействием и/или взаимодействием с образованием водородных связей, включая такие взаимодействия, как протекающие с образованием солевых мостиков и водных мостиков. Антитело к Тау по изобретению специфически связывает эпитоп в пределах Тау-полипептида. Неспецифическое связывание относится к связыванию с аффинностью менее примерно 10^{-7} М, например, к связыванию с аффинностью 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М и т.д.

Используемый в данном документе термин "CDR" или "гипервариабельный участок (участок, распознающий антиген)" означает антиген с неперекрывающимися эпитопами, объединяющий сайты в вариабельном участке и тяжелой, и легкой цепей полипептидов. CDRs были описаны в публикациях Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывание или наборы аминокислотных остатков по сравнению друг с другом. Тем не менее использование любого определения по отношению к CDR антитела или привитых антител, или их фрагментов охвачено объемом термина, определение которого дано выше и применяется в данном документе. Аминокислотные остатки, которые входят в CDRs, определение которых приведено в каждой из указанных ссылок, содержатся в табл. 1 в виде сравнения.

Таблица 1

Определения CDR

	ККabat ¹ (перечень послед.) ²	СChothia ³	МMacCallum ⁴
V _H CDR1	31-35 (31-35)	6-32	0-35
V _H CDR2	0-65 (50-66)	3-55	7-58
V _H CDR3	5-102 (99-106)	6-101	3-101
V _L CDR1	4-34 (24-39)	6-32	0-36
V _L CDR2	0-56 (55-61)	0-52	6-55
V _L CDR3	9-97 (94-102)	1-96	9-96

¹Нумерация остатков согласно номенклатуре по Kabat et al., supra.

²Соответствующие остатки согласно номенклатуре, приведенной в перечне последовательностей.

³Нумерация остатков согласно номенклатуре по Chothia et al., supra.

⁴Нумерация остатков согласно номенклатуре по MacCallum et al., supra.

Используемый в данном документе термин "каркасная область" при использовании в отношении вариабельного участка антитела означает все аминокислотные остатки вне областей CDR в пределах вариабельного участка антитела. Каркасная область вариабельного участка обычно представляет собой прерывистую аминокислотную последовательность длиной между примерно 100 и 120 аминокислотами, но относится только к аминокислотам, расположенным вне CDRs. Применяемый в данном документе термин "каркасная область" означает каждый домен каркасной области, который отделен при помощи CDRs.

Термин "выделенное" антитело относится к антителу, которое было идентифицировано и отделено и/или было выделено из компонента его природного окружения. Загрязняющими компонентами его природного окружения являются материалы, которые будут принимать участие при диагностическом или терапевтическом использовании антитела, и которые могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые вещества. В соответствии с некоторыми вариантами антитело очищают до степени (1), превышающей 90%, превышающей 95% или превышающей 98% от веса антитела, при определении методом Лоури, например, превышающей 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом или (3) до гомогенности с помощью электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением красителя Coomassie голубого или серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку по мень-

шей мере один компонент из природного окружения антитела будет отсутствовать. В некоторых случаях выделенное антитело получают при применении по меньшей мере одной стадии очистки.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые как взаимозаменяемые, относятся к полимерной форме аминокислот с любой длиной, которые могут включать генетически кодированные или не генетически кодированные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериализированные аминокислоты и полипептиды, содержащие модифицированные пептидные основные цепи. Этот термин охватывает слитые белки, включая, но без ограничения, слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые белки с гетерологичной и гомологичной лидерными последовательностями, с N-концевыми метиониновыми остатками или без них; иммунологически меченые белки и т.п.

Применяемые в данном документе термины "лечение", "лечащий" и т.п. относятся к получению желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Такой эффект может быть профилактическим в случае полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в случае частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного действия, приписываемого заболеванию. Термин "лечение", используемый в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, особенно у человека, и включает (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к этому заболеванию, но это заболевание еще не было диагностировано; (б) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития и (с) облегчение заболевания, т.е. появление регрессии заболевания.

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент", используемые в данном документе как взаимозаменяемые, относятся к млекопитающему, включая, но без ограничения, грызунов (крыс, мышей), нечеловеческих приматов, людей, собак, кошек, копытных животных (например, лошадей, коров и быков, овец, свиней, коз) и т.п.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству антитела к Тау, которое после введения млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для эффективного лечения этого заболевания. "Терапевтически эффективное количество" будет меняться в зависимости от вида антитела к Тау, вида заболевания и степени его серьезности и возраста, веса и т.д. субъекта, лечение которого проводится.

Термин "биологический образец" охватывает различные виды образцов, отобранные у субъекта, и может быть использован при проведении диагностики или мониторинга. Это определение охватывает кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы твердых тканей, такие как образцы при биопсии или культуры тканей или клеток, полученных из них, и их потомство. Этот термин включает также образцы, которые были обработаны любым путем после их получения, например были обработаны реагентами, солибилизованы или обогащены некоторыми компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин "биологический образец" охватывает клинический образец и включает также клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей. Термин "биологический образец" включает мочу, слюну, цереброспинальную жидкость, фракции крови, такие как плазма и сыворотка и т.п.

Перед дальнейшим описанием данного изобретения следует отметить, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами, так как, конечно, может быть изменено. Следует также иметь в виду, что терминология, использованная в данном документе, служит только для цели описания конкретных вариантов и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только формулой изобретения.

В тех случаях, когда приведен интервал величин, следует иметь в виду, что настоящее изобретение охватывает каждую величину, до десятой доли величины низшего предела, если из контекста не следует иное, между верхним и нижним пределами и любую другую указанную величину или величину, находящуюся в этом интервале. Верхний и нижний пределы этих меньших величин могут быть независимо включены в меньший интервал и также охвачены данным изобретением, с учетом специально исключенного (если это сделано) интервала в заявленном интервале. Когда заявленный интервал включает одно или два ограничения, пределы, исключаящие одно или оба ограничения, также входят в объем изобретения.

Если иное не оговаривается, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, которое понятно среднему специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые методы и материалы, похожие или эквивалентные описанным в данной заявке методам и материалам, также могут быть использованы в практике или тестировании данного изобретения, здесь описаны предпочтительные методы и материалы. Все публикации, упомянутые в данной заявке, включены в нее посредством отсылки и описывают способы и/или материалы, которые описаны в этих публикациях.

Необходимо отметить, что используемые в описании и в формуле изобретения формы в единственном числе включают и множественное число, если не оговорено иное. Так, например, ссылка на "гуманизированное антитело к тау" относится к множеству таких антител, и ссылка на "таупатию" относится к одному или более видов таупатий и их эквивалентам, известным специалистам в данной области, и т.д.

Следует также заметить, что формула изобретения должна быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Это утверждение должно служить основой для применения такой исключительной терминологии как "исключительно", "только" и т.п. в связи с описанием элементов формулы изобретения или применением "отрицательного" ограничения.

Следует также отметить, что некоторые признаки данного изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных элементов, могут быть также использованы в комбинации с одним элементом. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта, могут быть предусмотрены в отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов, относящиеся к данному изобретению, охвачены данным изобретением и описаны здесь, как если бы каждая комбинация индивидуально и ясно была раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов и их элементы также охвачены настоящим изобретением и раскрыты таким образом, как если бы каждая такая подкомбинация индивидуально и ясно была раскрыта.

Все публикации, обсуждавшиеся в данном описании, приведены только для их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто, содержащееся в данном документе, не должно толковаться как допущение, что настоящее изобретение не дает право относить к более ранней дате такую публикацию благодаря известному изобретению. Кроме того, даты публикации, указанные в настоящем описании, могут отличаться от действительных дат публикации, что может нуждаться в независимом подтверждении.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии, включающие введение антитела к тау. Данное изобретение предусматривает также антитела к Тау и композиции, их содержащие, для использования при осуществлении таких способов. Данное изобретение относится также к способам *in vitro* и *in vivo* определения, использующим антитело к Тау, описанное в настоящей заявке.

Способы лечения таупатии.

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения таупатии. Эти способы обычно включают введение эффективного количества антитела к Тау по данному изобретению субъекту, который нуждается в этом. В некоторых случаях введение субъекту антитела к Тау приводит к снижению уровня патологического Тау-полипептида в клетке, в ткани или жидкости субъекта и к лечению таупатии.

В некоторых случаях способы согласно данному изобретению включают снижение содержания бета-амилоида (A β) (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путем введения антитела к Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-158 в Тау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-18 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпитоп, и эпитоп, связанный антителом, включает аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-68 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-68 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Тау-полипептиде, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Тау-полипептиде, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 7-13 в Тау, например аминокислоты EFEVMD (SEQ ID NO: 87). В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 25-30 в Тау, например аминокислоты DQGGYT (SEQ ID NO: 88). В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 28-126 в Тау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 150-158 в Тау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 19-46 в Тау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61.

В некоторых случаях способ согласно данному изобретению включает снижение бета-амилоида

(A β) (например, A β_{40} и/или A β_{42}) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путем введения антитела, которое специфически связывает внеклеточный Тау (eТау), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 1-158 в eТау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61.

В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-18 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпитоп и содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 2-68 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау-полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48 (eТау; показана на фиг. 61) по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eТау, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eТау-полипептиде, при этом эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 7-13 в eТау, например, аминокислоты EFEVMED (SEQ ID NO: 87). В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 25-30 в eТау, например аминокислоты DQGGYT (SEQ ID NO: 88). В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 28-126 в eТау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 150-158 в eТау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный антителом, содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислот 19-46 в eТау, где нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности изоформы 2N4R Тау, показанной на фиг. 61.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного гуманизированного моноклонального антитела, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку. Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, которое содержит каркасную область гуманизированной легкой цепи и каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, при этом выделенное антитело конкурирует при связывании с эпитопом в N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, при этом антитело представляет собой фрагменты F_v, scF_v, Fab, F(ab')₂ или Fab', и антитело при связывании с эпитопом в N-концевом участке Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое содержит: а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последо-

вательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Например, согласно некоторым вариантам способ по изобретению может включать введение субъ-екту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного антитела, при этом выделенное антитело содержит константную область легкой цепи человека и константную область тяжелой цепи человека и выделенное антитело при связывании эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида конкурирует с антителом, которое включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам антитело содержится в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для введения человеку.

Антитело к Тау согласно настоящему изобретению связывает внеклеточный Тау. Термин "внеклеточный Тау" ("eТау"), используемый в данном документе, охватывает любой Тау-полипептид, который может быть детектирован в цереброспинальной жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам eТау представляет собой полипептид длиной в 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Тау; например, согласно некоторым вариантам eТау является полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам eТау представляет собой полипептид длиной в 171 аминокислоту и содержит аминокислоты 2-172 (SEQ ID NO: 44) полноразмерного Тау; например, согласно некоторым вариантам eТау является полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам eТау представляет собой полипептид eТау2 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам eТау представляет собой полипептид eТау3 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам eТау представляет собой полипептид eТау4 и содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 48.

В некоторых случаях полипептид eТау имеет длину от примерно 50 до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 до примерно 75 аминокислот (aa), от примерно 75 до примерно 100 aa, от примерно 100 до примерно 125 aa, от примерно 125 до примерно 150 aa или от примерно 150 до примерно 175 aa; и может содержать от примерно 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от примерно 150 до примерно 175 перекрывающихся аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Тау. Примеры полипептидов eТау представлены на фиг. 20.

Как описано более подробно ниже, антитело к Тау по данному изобретению специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, является линейным и содержит остатки аминокислот в пределах аминоконцевого (N-концевого участка) Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 в Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау, в пределах аминокислот 15-44 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау. Аминокислотные последовательности изоформ человеческого Тау представлены на фиг. 6A-D. Аминокислотами 1-18 в Тау являются: MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO: 53). См., например, Garcia-Sierra et al. (2003), J. Alzheimer's Disease 5:65; и Horowitz et al. (2004), J. Neurosci. 24:7895. Аминокислотами 15-24 в Тау являются: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51).

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по данному изобретению специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный антителом, представляет собой линейный эпитоп и содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау, при этом этот эпитоп не включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау, при этом этот эпитоп включает фосфорилированную аминокислоту. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау согласно данному изобретению специфически связывает линейный эпитоп, содержащий остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах ами-

кислот 1-25 в Тау, в пределах аминокислот 1-18 в Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Тау, в пределах аминокислот 15-44 в Тау, в пределах аминокислот 13-24 в Тау или в пределах аминокислот 15-24 в Тау); и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

IPN001 (обозначаемый в данном документе "IPN1" или "IPN-1") и IPN002 (обозначаемый в данном документе "IPN2" или "IPN-2") специфически связывают Тау. Эпитоп, связываемый IPN001, является линейным эпитопом и содержит остатки аминокислот в пределах аминоконцевого (N-концевого) участка Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау.

В некоторых случаях антитело к Тау согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает а) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по Кабату (см., например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

В некоторых случаях антитело к Тау согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001; и ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; b) область тяжелой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001; и i) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по Чотиа (Chothia) (см., например, табл. 1 выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В других случаях антитело к Тау согласно данному изобретению, которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения таупатии, включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по системе Kabat (см., например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

В других случаях антитело к Тау по изобретению (например, антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде, причем эпитоп находится в аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау, в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау, включает а) область легкой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN002 и (ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN002 и (ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, где V_H и V_L CDRs определены согласно номенклатуре по системе Chothia (см., например, табл. 1, выше; и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

В некоторых случаях настоящего изобретения способ лечения таупатии включает введение субъекту, который нуждается в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей а) антитело, которое специфически связывает линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау (при этом аминокислоты 1-18 Тау представляют собой: MAEPRQEFVMEHDAGTY; SEQ ID NO: 53), в пределах аминокислот 15-44 Тау, в пределах аминокислот 13-24 Тау или в пределах аминокислот 15-24 Тау (при этом аминокислоты 15-24 Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)), причем такое антитело включает (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и b) фармацевтически приемлемый эксципиент, подходящий для введения человеку.

Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN001 представлены на фиг. 1A и 1B. CDRs (как определено согласно номенклатуре по Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN002 представлены на фиг. 2A и 2B. CDRs (определенные согласно номенклатуре по Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

SEQ ID NOS:1-12 являются следующими:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);
 KVSKRFS (SEQ ID NO:2);
 FQGSLVPA (SEQ ID NO:3);
 SYGMS (SEQ ID NO:4);
 TISSSGSRTYFPDSVKG (SEQ ID NO:5);
 TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);
 KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);
 KVSNRFS (SEQ ID NO:8);
 FQGSLVPA (SEQ ID NO:9);
 KYGMS (SEQ ID NO:10);
 TISSSGSRYYPDSVKG (SEQ ID NO:11);
 SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

В некоторых случаях антитело включает каркасную область гуманизированной легкой цепи и/или каркасную область гуманизированной тяжелой цепи. Гуманизированные антитела к Тау описаны более подробно ниже.

Таупатия представляет собой заболевание, характеризующееся аномальным уровнем Тау в клетке, в ткани или в жидкости в организме субъекта. В некоторых случаях таупатия характеризуется повышенными (превышающими норму) уровнями Тау или Тау-полипептидов и/или патологических форм Тау в клетке, в ткани или в жидкости. Например, в некоторых случаях таупатия характеризуется наличием повышенных уровней Тау или Тау-полипептидов и/или патологических форм Тау в ткани мозга и/или в цереброспинальной жидкости (ликворе). "Превышающий норму" уровень Тау в клетке, в ткани или в жидкости в организме показывает, что уровень Тау в ткани или в жидкости выше, чем нормальный, контролируемый уровень, например, выше, чем нормальный, контролируемый уровень у субъекта или популяции субъектов одной возрастной группы. См., например, Blomberg et al. (2001), "Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals", *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12:127. В некоторых случаях субъект, больной таупатией, проявляет один или более дополнительных симптомов таупатии (например, ухудшение когнитивных способностей).

В других случаях таупатия характеризуется наличием уровня Тау в клетке, в ткани или в жидкости, который ниже нормального. Уровень Тау "ниже нормального" в ткани или в жидкости показывает, что уровень Тау в клетке, в ткани или в жидкости ниже, чем нормальный, контролируемый уровень у субъекта или популяции субъектов одной возрастной группы.

Болезнь Альцгеймера или некоторые формы лобно-височной деменции (болезнь Пика, спорадические случаи лобно-височной деменции и лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с нарушением в хромосоме 17) являются наиболее распространенными формами таупатии. Настоящее изобретение предусматривает способ лечения, описанный выше, при этом таупатия представляет собой болезнь Пика, спорадические случаи лобно-височной деменции и лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с нарушением в хромосоме 17. Другие виды таупатии включают, но без ограничения, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и подострый склерозирующий панэнцефалит.

Нейродегенеративные таупатии включают болезнь Альцгеймера, комплекс боковой амиотрофической склероз/паркинсонизм-деменция, деменцию с аргирофильными гранулами, амилоидную ангиопатию британского типа, церебральную амилоидную ангиопатию, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию боксеров, диффузные нейрофибриллярные узлы с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височную деменцию (FTD), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с нарушением в хромосоме 17, лобно-височную лобарную дегенерацию, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Галлевордена-Шпатца, миозит с включенными тельцами, множественную системную атрофию, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, болезнь двигательного нейрона с нейрофибриллярными клубками не гуамского происхождения, болезнь Пика, постэнцефалический паркинсонизм, церебральную амилоидную ангиопатию с переносом прионов, прогрессирующий субкортикальный глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию только с нейрофибриллярными сплетениями (Tangle only dementia), мультиинфарктную деменцию, ишемический инсульт, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), травматическое повреждение мозга (ТВИ) и инсульт.

Настоящее изобретение предусматривает также способы лечения синуклеинопатий, например болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т.д. Например, применяя способ по изобретению, можно осуществлять лечение субъекта, больного PD с деменцией (PDD).

Согласно одному из вариантов антитело к Тау по данному изобретению предотвращает или задерживает начало возникновения по меньшей мере одного симптома нейродегенеративной таупатии у субъекта. Согласно одному из вариантов антитело к Тау по изобретению ослабляет или устраняет по мень-

шей мере один симптом нейродегенеративной таупатии у субъекта. Симптомом может быть образование одного или более отложений патологического Тау; внеклеточного растворимого Тау и/или фрагментов Тау; отложения гиперфосфорилированного Тау; отложения нерастворимого Тау; нейрофибриллярных узлов; нейрофибриллярных волокон; появление агрегатов фосфо-Тау перед образованием узлов; нейрофибриллярных узлов внутри нейронов; гиперактивность нейронов и появление нейрофибриллярных узлов вне нейронов в головном мозге или в спинном мозге субъекта. Такой симптом может быть неврологическим, например ухудшенной когнитивной способностью, ухудшением памяти, потерей двигательной (моторной) функции и т.д. В некоторых случаях антитело к Тау по изобретению может улучшать когнитивные способности. В некоторых случаях антитело к Тау по изобретению может снижать скорость ухудшения когнитивных способностей. В некоторых случаях антитело к Тау по изобретению может улучшать двигательную функцию. В некоторых случаях антитело к Тау по изобретению может снижать скорость ухудшения двигательной функции.

Симптомом может также быть уровень Тау-полипептида в CSF субъекта. Например, согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению при его введении субъекту с таупатией в одной или более дозах в случае монотерапии или в случае комбинированной терапии снижает уровень Тау-полипептида в CSF субъекта по меньшей мере на примерно 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на примерно 20%, по меньшей мере на примерно 25%, по меньшей мере на примерно 30%, по меньшей мере на примерно 40%, по меньшей мере на примерно 50% или более чем на 50% по сравнению с уровнем Тау-полипептида в CSF субъекта до начала лечения антителом к Тау. Введение субъекту антитела к Тау по изобретению может привести к одному или более результатам из уменьшения количества свободного внеклеточного Тау в тканях мозга; уменьшения передачи Тау (например, фрагментов Тау) от клетки к клетке (например, передачи от нейрона к нейрону); уменьшения количества агрегатов Тау (например, внутриклеточных (в том числе, внутринейронных) агрегатов Тау); уменьшения количества нейрофибриллярных узлов в тканях мозга; уменьшения уровня микроглиальной активации и/или активации астроцитов; уменьшения количества фосфорилированного Тау; уменьшения количества гиперфосфорилированного Тау; уменьшения количества общего Тау (например, общего внутриклеточного Тау и/или общего внеклеточного Тау); уменьшения количества свободного Тау (например, Тау, который не связан с антителом к Тау субъекта); уменьшения гиперактивности нейронов и уменьшения количества N-концевых фрагментов Тау. "Общий Тау" может включать суммарное количество общего полноразмерного Тау любой изоформы и любых N-концевых фрагментов Тау, которые содержатся и которые выявляют эпитоп, распознаваемый антителом к Тау по изобретению. Аминокислотные последовательности человеческого полноразмерного Тау представлены на фиг. 6A-D. Снижение уровня фосфорилированного Тау может быть определено при помощи любого известного метода, например, иммунологического метода с использованием антитела к фосфорилированному Тау.

Введение антитела к Тау по изобретению субъекту может привести к изменению одного или более показателей а) количества свободного внеклеточного Тау в ткани мозга; b) количества свободного внеклеточного Тау в интерстициальной жидкости (ISF); c) количества свободного внеклеточного Тау в цереброспинальной жидкости (CSF); d) передачи Тау от нейрона к нейрону; e) количества агрегатов Тау внутри нейронов; f) степени микроглиальной активации и/или активации астроцитов; g) количества фосфорилированного или гиперфосфорилированного Тау; h) количества общего Тау или свободного Тау в ISF или CSF; i) количества внутриклеточных N-концевых фрагментов Тау; j) гиперактивности нейронов; k) количества $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в CSF; l) объема бляшек $A\beta$; m) секреции $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ из нейрона; n) активности промотора предшественника амилоида (APP); o) уровня мРНК APP и/или уровня белка; p) активности бета-секретазы и/или гамма-секретазы; q) состояния активации $A\beta$ -индуцированного сигнального пути; r) количества общего внутриклеточного Тау или свободного Тау; s) количества конъюгата антитело к тау-связанный Тау в ISF или CSF и t) количества внутриклеточного конъюгата антитело к тау-связанный Тау.

Введение антитела к Тау по изобретению субъекту в некоторых случаях может улучшить познавательные способности субъекта, по меньшей мере снизить скорость ухудшения познавательной функции у субъекта.

В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает количество свободного внеклеточного Тау-полипептида (например, количество свободного внеклеточного Тау-полипептида в ткани мозга) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более, чем на 50% по сравнению с количеством свободного внеклеточного Тау-полипептида у субъекта перед введением антитела к Тау.

В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает передачу Тау-полипептида (например, патологического Тау-полипептида) от клетки к клетке (например, от нейрона к нейрону) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более чем на 50% по сравнению с передачей от клетки к клетке перед введением антитела к Тау по изобретению.

В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает количество агрегатов Тау (например, внутриклеточных (в том числе, внутри нейронов) агрегатов Тау) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более чем на 50% по сравнению с количеством агрегатов Тау перед введением антитела к Тау по изобретению.

В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает нейротоксичность у субъекта и/или нейровоспаление у субъекта; и/или снижает активность астроцитов и микроглии; и/или снижает индукцию патологических электрофизиологических ответов, и/или уменьшает количество Тау в экзосомах.

В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает гиперактивность нейронов по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более чем на 50% по сравнению с уровнем степени гиперактивности нейронов перед введением антитела к Тау. В некоторых случаях введение антитела к Тау по изобретению субъекту уменьшает гиперактивность нейронов по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более чем на 50%, о чем свидетельствуют данные регистрации фиксации общего потенциала нейрона; например, регистрации фиксации общего потенциала кортикального нейрона, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC-CN) или культур кортикальных нейронов человека (НСС).

Введение подходящих композиций можно осуществлять разными путями, например внутривенно, интраперитонеально, подкожно, интракраниально, интратекально, интраартериально (например, через сонную артерию), внутримышечно, интраназально, топически или внутрикожно или путем доставки в спинной мозг или в головной мозг. Аэрозольные составы, такие как составы для назального спрея, включают очищенные водные или другие растворы активного агента вместе с консервантами и изотоническими агентами. У таких составов регулируют значение pH и изотоническое состояние, чтобы они были совместимыми с мукозными мембранами в носу.

В некоторых случаях антитело к Тау по изобретению может быть модифицировано или введено в такой состав, чтобы обеспечить способность этого антитела пересекать гематоэнцефалический барьер. Такое антитело или композиция, содержащая антитело, могут быть введены субъекту, больному таупатией, различными энтеральными и парентеральными путями, включая пероральное, внутривенное введение и т.п. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртоводные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные растворы. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Носители для внутривенного введения включают наполнители жидкостей и питательных веществ, наполнители электролитов (такие как на основе раствора Рингера с декстрозой) и т.п. В составах также могут быть консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция по изобретению может включать другие агенты, такие как дофамин или психофармакологические лекарства в зависимости от предполагаемого использования фармацевтической композиции.

Схема лечения определяется практикующим врачом или другими медицинскими работниками на основе различных клинических факторов. Как хорошо известно в медицине, дозы для любого конкретного пациента зависят от различных факторов, включая вес пациента, площадь поверхности тела, возраст, вид конкретного вводимого соединения, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и вид других лекарств, которые вводятся совместно. Доза антитела к Тау по изобретению может составлять, например, от 0.001 до 1000 мкг; однако могут применяться дозы выше и ниже указанных пределов, особенно с учетом указанных выше факторов. Обычно доза может быть равна, например, от примерно 0.0001 до 100 мг/кг или от примерно 0.01 до 5 мг/кг (например, 0.02, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 мг/кг и т.д.) веса субъекта. Например, доза может составлять 1 мг/кг веса тела или 10 мг/кг веса тела или быть в пределах 1-10 мг/кг или по меньшей мере 1 мг/кг. Дозы, являющиеся промежуточными в указанном интервале, также входят в объем данного изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, в чередующиеся дни, еженедельно или в соответствии с любым другим расписанием, определенным эмпирическим путем. Типичная схема лечения включает введение антитела в виде многократных доз в течение продолжительного периода времени, например по меньшей мере в течение шести месяцев. Другой вид лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Примерные дозы включают 1-10 или 15 мг/кг в течение последовательных дней, 30 мг/кг в течение чередующихся дней или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах вводятся одновременно два или более моноклональных антитела с разными специфичностями связывания, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных интервалов доз. Мониторинг течения заболевания проводят периодически.

Комбинированная терапия.

Антитело к Тау по изобретению можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, само по себе (например, в случае монотерапии) или при комбинированной терапии вместе с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

При лечении AD подходящие дополнительные терапевтические агенты включают, но без ограничения, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, в том числе, но без ограничения, Agicept (донепезил), Exelon (ривастигмин), метрифонат и такрин (Cognex); антитело к Аβ; нестероидные противовоспалительные агенты, включая, но без ограничения, ибупрофен и индометацин; ингибиторы циклооксигеназы-2 (Cox2), такие как Celebrex (целебрекс); и ингибиторы моноаминоксидазы, такие как Selegilene (эльдеприл или депренил). Дозировка каждого из указанных агентов известна в уровне техники.

Другим подходящим дополнительным агентом при лечении AD является агент, который ингибирует агрегацию Тау, например производное нафтохинона, которое ингибирует агрегацию Тау, как описано в патенте США № 7605179. Другим подходящим дополнительным агентом является агент, который ингибирует фосфорилирование Тау, например, 3-замещенное производное 4-пиримидона, которое ингибирует тау-протеинкиназу 1, как описано в патенте США № 7572793.

Термин "в комбинации с", используемый в данном документе, относится к применению, когда, например, первое соединение вводится в течение полного курса введения второго соединения; когда первое соединение вводится в течение периода времени, который перекрывается с со временем введения второго соединения, например, когда введение первого соединения начинается до введения второго соединения и введение первого соединения заканчивается до того, как закончится введение второго соединения; когда введение второго соединения начинается до начала введения первого соединения и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; когда введение первого соединения начинается до введения второго соединения и введение второго соединения заканчивается до окончания введения первого соединения; когда введение второго соединения начинается до начала введения первого соединения и введение первого соединения заканчивается до окончания введения второго соединения. Как таковой термин "в комбинации с" может также относиться к схеме лечения, включающей введение двух или более соединений. Термин "в комбинации с", используемый в данном документе, относится также к введению двух или более соединений, которые могут быть введены в одном и том же составе или в разных составах, одним и тем же или разными путями и в одних и тех же или разных дозах.

Субъекты, подвергающиеся лечению.

Субъекты, подходящие для лечения антителом к Тау по изобретению, включают субъектов, у которых была диагностирована таупатия; субъектов, которые могут заболеть таупатией с большим риском, чем обычная популяция (например, субъекты, имеющие генетическую предрасположенность к возникновению таупатии); субъектов с PDD и т.п. В некоторых случаях таким субъектом является взрослый человек. В некоторых случаях взрослому человеку исполнилось 30 лет или больше; 40 лет или больше, 50 лет или больше, 60 лет или больше, 70 лет или больше, или 80 лет или больше. Например, такой взрослый человек может быть в возрасте от 40 до 50 лет, от 50 до 60 лет, от 60 до 70 лет или старше 70 лет.

Способы снижения уровней Аβ₄₀ и Аβ₄₂.

Настоящее изобретение предусматривает способ снижения уровня бета-амилоидного полипептида (например, Аβ₄₀ и/или Аβ₄₂) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта. Этот способ обычно включает введение субъекту а) эффективного количества антитела, которое специфически связывает N-концевую область Тау-полипептида; или б) фармацевтической композиции, содержащей такое антитело. В некоторых случаях антитело является гуманизированным. Внеклеточной жидкостью может быть, например, CSF, ISF, кровь или фракция крови, такая как плазма или сыворотка.

В некоторых случаях антитело, которое специфически связывает N-концевую область Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения уровней Аβ₄₀ и Аβ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости, представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау, который находится в пределах аминокислот 2-176 Тау, например в пределах аминокислот 2-15, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 15-50, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140, аминокислот 150-176 или аминокислот 140-160 в Тау. Примеры Тау-полипептидов приведены на фиг. 20; антитело, которое снижает уровень Аβ₄₀ и/или Аβ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, может быть гуманизированным антителом, которое специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде, показанном на фиг. 20.

Гуманизированное антитело, которое связывает N-концевую область Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения уровней Аβ₄₀ и Аβ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости, представляет собой гуманизированное антитело, которое связывает эпитоп Тау, который находится в пределах аминокислот 2-176 Тау, например в пределах аминокислот 2-15, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 15-50, аминокислот 50-75, аминокис-

лот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140, аминокислот 150-176 или аминокислот 140-160 в Тау. Примеры Тау-полипептидов приведены на фиг. 20; антитело, которое снижает уровень $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости у субъекта, может быть гуманизированным антителом, которое специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде, показанном на фиг. 20.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости и которое пригодно для применения в способе по изобретению, может быть гуманизированным антителом к Тау по данному изобретению. В некоторых случаях антитело является гуманизированным антителом, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 в Тау.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау в пределах аминокислот 1-158 в Тау, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140 или аминокислот 150-158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Тау, например, как показано на фиг. 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау в пределах аминокислот 1-158 в Тау, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140 или аминокислот от 150 до 158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Тау, например, как показано на фиг. 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или в CSF по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау в пределах аминокислот 1-158 в Тау, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот от 125 до 150, аминокислот от 115 до 140 или аминокислот от 150 до 158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Тау, например, как показано на фиг. 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое связывает N-концевой участок Тау-полипептида и которое пригодно для применения в способе снижения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или в ISF по изобретению, представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау в пределах аминокислот 1-158 в Тау, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 19-46, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот от 40 до 60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот от 125 до 150, аминокислот от 115 до 140 или аминокислот от 150 до 158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в 2N4R Тау, например, как показано на фиг. 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях способы по изобретению включают снижение содержания бета-амилоида ($A\beta$) (например, $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$) в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) путем введения антитела к Тау, при этом эпитоп, связанный таким антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот в последовательности 2N4R Тау, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом этот эпитоп, связанный указанным антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-18 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает Тау, при этом этот эпитоп, связанный указанным антителом, представляет собой линейный эпитоп, и эпитоп, связанный указанным антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое вводится, специфически связывает eТау4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной после-

довательности, представленной SEQ ID NO: 48 (e-Ta ν ; показана на фиг. 61) по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Та ν -полипептиде, причем эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в Та ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Та ν -полипептиде, причем эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в Та ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Та ν -полипептиде, причем эпитоп находится в пределах аминокислот 7-13 в Та ν , например аминокислот EFEVMED (SEQ ID NO: 87). В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в Та ν -полипептиде, причем эпитоп находится в пределах аминокислот 25-30 в Та ν , например, аминокислот DQGGYT (SEQ ID NO: 88). В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает Та ν , причем эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 28-126 в Та ν , при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает Та ν , причем эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 150-158 в Та ν , при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает Та ν , причем эпитоп, связанный указанным антителом, находится в пределах аминокислот 19-46 в Та ν , при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61.

В некоторых случаях способ по данному изобретению включает снижение содержания бета-амилоида (A β) (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)) путем введения антитела, которое специфически связывает внеклеточный Та ν (eТа ν), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 1-158 в eТа ν , при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61.

В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает e-Ta ν , при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-18 eТа ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает eТа ν , при этом эпитоп, связанный этим антителом, представляет собой линейный эпитоп, и эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 eТа ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает eТа ν 4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 48 (eТа ν ; показана на фиг. 61) по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eТа ν 4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 2-68 в eТа ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в eТа ν 4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 15-24 в eТа ν . В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает линейный эпитоп в e-Ta ν 4-полипептиде, при этом этот эпитоп находится в пределах аминокислот 7-13 в eТа ν , например аминокислот EFEVMED (SEQ ID NO: 87). В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает eТа ν , при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 28-126 в eТа ν , и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает eТа ν , при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 150-158 в eТа ν , и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело к Та ν , которое вводится, специфически связывает eТа ν , при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 19-46 в eТа ν , и нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Та ν , показанной на фиг. 61.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида (например, накоплением A β ₄₀ и/или A β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)). Этот способ обычно включает введение субъекту а) эффективного количества антитела (например, моноклонального антитела), при этом такое антитело может необязательно быть гуманизированным антителом, которое связывает N-концевой участок Та ν -полипептида; или б) фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело.

Болезнь, ассоциируемая с накоплением бета-амилоида, согласно настоящему изобретению может быть заболеванием, при котором уровень A β ₄₀ и/или A β ₄₂ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта выше, чем нормальный контрольный уровень. Заболевания, ассоциируемые с накоплением бета-амилоида, включают, например, болезнь Альцгеймера. Способы лечения согласно настоящему изобретению могут обеспечить снижение уровней бета-амилоидного белка (например, A β ₄₀ и/или A β ₄₂ в

нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка)) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более, чем на 50%, по сравнению с уровнем бета-амилоидного белка у субъекта, не подвергавшегося лечению при помощи антитела к Тау. Так, например, в некоторых случаях эффективное количество антитела к Тау представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня $A\beta_{40}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более, чем на 50%, по сравнению с уровнем $A\beta_{40}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Тау или перед началом лечения при помощи антитела к Тау. В некоторых случаях эффективное количество антитела к Тау представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня $A\beta_{42}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более, чем на 50% по сравнению с уровнем $A\beta_{40}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Тау или перед началом лечения при помощи антитела к Тау. В некоторых случаях эффективное количество антитела к Тау представляет собой то количество, которое обеспечивает снижение уровня $A\beta_{42}$ и $A\beta_{40}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50% или более, чем на 50% по сравнению с уровнем $A\beta_{42}$ и $A\beta_{40}$ в нейроне (нервной клетке) и/или во внеклеточной жидкости в отсутствие лечения при помощи антитела к Тау или перед началом лечения при помощи антитела к Тау. Антитело, которое связывает N-концевой участок Тау-полипептида (возможно гуманизированное антитело, например моноклональное антитело) и которое пригодно для применения при осуществлении способа лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, по изобретению представляет собой антитело, которое связывает эпитоп Тау, который находится в пределах аминокислот 1-158 в Тау, например в пределах аминокислот 1-15, аминокислот 7-13, аминокислот 2-18, аминокислот 15-24, аминокислот 24-50, аминокислот 2-25, аминокислот 19-46, аминокислот 25-30, аминокислот 15-50, аминокислот 28-126, аминокислот 50-75, аминокислот 40-60, аминокислот 75-100, аминокислот 60-80, аминокислот 100-125, аминокислот 80-115, аминокислот 125-150, аминокислот 115-140 или аминокислот 150-158 в Тау, при этом нумерация аминокислот основана на аминокислотной последовательности 2N4R Тау, например, показанной на фиг. 61. В некоторых случаях антитело является гуманизированным.

В некоторых случаях антитело, которое снижает уровень бета-амилоида (например, $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$) в нейроне и/или во внеклеточной жидкости (например, в CSF, ISF, в крови или во фракции крови, такой как плазма или сыворотка) у субъекта и пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, представляет собой гуманизированное антитело к Тау по изобретению. В некоторых случаях антитело является гуманизированным антителом, которое связывает эпитоп (например, линейный эпитоп) в пределах аминокислот 15-24 в Тау.

В некоторых случаях способ снижения уровней бета-амилоида включает введение антитела к Тау, которое не требует наличия инсерции 2N Тау для связывания с Тау. В некоторых случаях эпитоп, распознаваемый антителом к Тау, пригодный для применения в способе снижения уровней бета-амилоида (например, $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$) в нейроне и/или во внеклеточной жидкости у субъекта по изобретению не находится в инсерции 2N Тау. Инсерция 2N в Тау включает аминокислоты 45-102 аминокислотной последовательности 2N4R, показанной на фиг. 61.

В некоторых случаях антитело к Тау, которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает Тау, при этом эпитоп, связанный этим антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в Тау. В некоторых случаях антитело к Тау, которое пригодно для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает внеклеточный Тау (eТау), при этом эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, пригодное для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает eТау, при этом эпитоп, связанный этим антителом, представляет собой линейный эпитоп. и этот эпитоп, связанный антителом, содержит остатки аминокислот в пределах аминокислот 2-68 в eТау. В некоторых случаях антитело к Тау, пригодное для применения в способе лечения заболевания, ассоциируемого с накоплением бета-амилоида, специфически связывает eТау4-полипептид, имеющий последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 48 (eТау; показана на фиг. 61), по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%. В некоторых случаях антитело к Тау,

Антитела к тау.

Настоящее изобретение предусматривает выделенные антитела к Тау и фармацевтические композиции, содержащие эти антитела.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах N-концевого участка Тау-полипептида (например, линейный эпитоп в пределах аминоконцевого (N-концевого) участка Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 в Тау, в пределах аминокислот 1-18 в Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Тау (где аминокислотами 1-18 в Тау являются: MAEPRQFEFVEMEDHAGTY; SEQ ID NO: 53), в пределах аминокислот 15-44 в Тау, в пределах аминокислот 13-24 в Тау или в пределах аминокислот 15-24 в Тау (где аминокислотами 15-24 в Тау являются: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)). В некоторых случаях антитело представляет собой гуманизованное антитело, например, одна или более каркасных областей варибельного участка тяжелой цепи и/или варибельного участка легкой цепи включают последовательности, полученные из каркасной области иммуноглобулина человека.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное гуманизованное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. В некоторых случаях эпитоп не содержит фосфорилированной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп не содержит нитрованной аминокислоты. В некоторых случаях эпитоп содержит фосфорилированную аминокислоту, нитрованную аминокислоту или и фосфорилированную кислоту и нитрованную кислоту.

Гуманизация каркасной(ых) области(ей) снижает риск того, что у людей будет возникать реакция на человеческое антимышиное антитело ХАМА (НАМА). Признанные в уровне техники методы определения иммунного ответа можно применять для мониторинга реакции на НАМА у конкретного пациента или во время клинических испытаний. У пациентов с введенными гуманизованными антителами проводят оценку иммуногенности в начале терапевтического лечения и в течение его проведения. Реакцию на НАМА оценивают, например, путем обнаружения антител к гуманизованному терапевтическому реагенту в образцах сыворотки, отобранных у пациента, с использованием метода, известного в уровне техники, включая технологию поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) и/или метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Во многих случаях гуманизованное антитело к Тау по изобретению по существу не приводит к возникновению реакции на НАМА у человека. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау по изобретению снижало иммуногенный потенциал, что подтверждалось методом анализа EpiScreen™, который осуществляли с использованием мононуклеарных клеток периферической крови, истощенных по CD8⁺-клеткам. В некоторых случаях гуманизованное антитело к Тау по изобретению характеризовалось индексом стимуляции менее 2.0.

Некоторые аминокислоты из остатков каркасной области варибельного участка человека выбираются для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Необычное смежное положение областей мышиных CDR и каркасной области варибельного участка человека может привести к необычным конформационным ограничениям, которые, если их не скорректировать путем замены остатков некоторых аминокислот, приведут к потере аффинности связывания.

Выбор остатков аминокислот для замены может быть частично определен при помощи компьютерного моделирования. Компьютерное аппаратное и программное обеспечение для получения трехмерных изображений молекул иммуноглобулинов известно в уровне техники. В общем, молекулярные модели цепей иммуноглобулина или их доменов создают, исходя из растворенных структур. Цепи, которые нужно моделировать, сравнивают на подобие аминокислотных последовательностей с цепями или доменами растворенных трехмерных структур, и цепи или домены, которые характеризуются самым большим подобием последовательностей, выбирают в качестве исходных для создания молекулярной модели. Цепи или домены, обладающие идентичностью последовательностей равной по меньшей мере 50%, выбирают для моделирования, например, те, которые обладают идентичностью последовательностей, составляющей по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или более чем 90%, выбирают для моделирования. Растворенные исходные структуры модифицируют для получения разницы между действительными аминокислотами в цепях или доменах иммуноглобулина, которые моделируют, и аминокислотами в исходной структуре. Затем модифицированные структуры собирают в сложную молекулу иммуноглобулина. Наконец, модель очищают путем минимизации энергии и проверки того, что все атомы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга и что длины связей и углы находятся в химически приемлемых пределах.

CDR и каркасные области определяются в соответствии с номенклатурой по Кабату, см. Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991). Альтернативное определение структуры было предложено Чотиа, см. Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature, 342:878 (1989); and J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (эти обе публикации объединены под названием "Chothia"). Когда остатки каркасной области, определенные согласно номенклатуре по Kabat, supra, составляют структурную петлю, определенную согласно номенклатуре по Chothia, supra, аминокислоты, содержащиеся в мышинном антителе, могут быть выбраны для замены в гуманизованном антителе. Остатки, которые "расположены рядом с областью CDR", включают остатки аминокислот в положениях, непосредственно прилегающих к одной или более CDRs в первичной последовательности гуманизованной цепи иммуноглобулина, например, в положениях, непосредственно прилегающих к

CDR, как определено согласно номенклатуре по Kabat, или к CDR, как определено согласно номенклатуре по Chothia (см., например, Chothia and Lesk JMB, 196:901 (1987)). Есть основания полагать, что эти аминокислоты взаимодействуют с аминокислотами в CDRs и, если выбраны из акцепторов, деформируют донорские CDRs и снижают аффинность. Более того, соседние аминокислоты могут взаимодействовать непосредственно с антигеном (Amit et al., Science, 233:747 (1986)), и выбор этих аминокислот из доноров может быть желательным для поддержания всех контактов антигена, которые обеспечивают аффинность в исходном антителе.

Настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело, содержащее каркасную область гуманизированной легкой цепи и каркасную область гуманизированной тяжелой цепи, при этом при связывании с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида выделенное антитело конкурирует с антителом, которое включает а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи находятся в разных полипептидах. В других случаях область легкой цепи и область тяжелой цепи находятся в одном полипептиде. Выделенное антитело может включать тяжелую цепь, которая содержит константную область изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В других случаях антитело является фрагментом Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. Антитело может включать ковалентно связанный непептидный синтетический полимер, например, синтетическим полимером является полиэтиленгликоль. В некоторых случаях выделенное антитело связано, непосредственно или при помощи линкера, с молекулой носителя, пептида или белка, который способствует переносу (транспорту) через гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях эпитоп, связанный выделенным антителом, находится в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида. Каркасная область гуманизированной легкой цепи выделенного антитела может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, показанных в табл. 3. Каркасная область гуманизированной легкой цепи выделенного антитела содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, показанных в табл. 2.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 Тау, в пределах аминокислот 1-18 Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау (причем аминокислоты 1-18 в Тау представляют собой MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO: 53), в пределах аминокислот 15-44 в Тау, в пределах аминокислот 13-24 в Тау или в пределах аминокислот 15-24 в Тау (причем аминокислоты 15-24 в Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)), включает а) область легкой цепи, содержащую (i) один, два или три гипервариабельных участка (CDRs) антитела IPN001, при этом CDRs являются участками, определенными в соответствии с номенклатурой по Kabat (см., например, табл. 1 выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 в Тау, в пределах аминокислот 1-18 в Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Тау (причем аминокислоты 1-18 в Тау представляют собой MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO: 53), в пределах аминокислот 15-44 в Тау, в пределах аминокислот 13-24 в Тау или в пределах аминокислот 15-24 в Тау (причем аминокислоты 15-24 в Тау представляют собой: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)), включает а) область легкой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001 и (ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и б) область тяжелой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001 и (ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи; при этом V_H и V_L CDRs определены в соответствии с номенклатурой по Kabat (см., например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)). Согласно некоторым из этих вариантов антитело к Тау включает гуманизированную каркасную область V_H и/или V_L .

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп в аминоконцевой (N-концевой) части Тау, например, в пределах аминокислот 1-25 в Тау, в пределах аминокислот 1-18 в Тау, в пределах аминокислот от 9 до 18 в Тау (причем аминокислоты 1-18 в Тау представляют собой: MAEPRQEFVEMDHAGTY; SEQ ID NO: 53), в пределах аминокислот 15-44 в Тау, в пределах аминокислот 13-24 в Тау или в пределах аминокислот 15-24 в Тау (причем аминокислоты 15-24 в Тау представляют собой AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)), включает а) область легкой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_L CDRs антитела IPN001 и (ii) каркасную область гуманизированной легкой

кой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую (i) один, два или три участка V_H CDRs антитела IPN001 и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи; при этом V_H и V_L CDRs определены в соответствии с номенклатурой по Chothia (см., например, табл. 1 выше; и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау-полипептида (где аминокислоты 1-18 Тау: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; (SEQ ID NO: 53)), в пределах аминокислот 15-44 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Тау-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида (где аминокислоты 15-24 Тау-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)) включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три домена (участка) V_L CDR антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую i) один, два или три домена (участка) V_H CDR антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи; где V_H и V_L CDR определяются в соответствии с номенклатурой Kabat (см., например, табл. 1, выше; и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау-полипептида (где аминокислоты 1-18 Тау: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; (SEQ ID NO: 53)), в пределах аминокислот 15-44 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Тау-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида (где аминокислоты 15-24 Тау-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)) включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три участка V_L CDR антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую i) один, два или три участка V_H CDR антитела IPN002 и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи; где V_H и V_L CDR определяются в соответствии с номенклатурой Chothia (см., например, табл. 1, выше; и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау-полипептида (где аминокислоты 1-18 Тау: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; (SEQ ID NO: 53)), в пределах аминокислот 15-44 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Тау-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида (где аминокислоты 15-24 Тау-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)) включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению, например антитело по изобретению, которое специфически связывает эпитоп на Тау-полипептиде, например линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида, в пределах аминокислот от 9 до 18 Тау-полипептида (где аминокислоты 1-18 Тау: MAEPRQEFVEMEDHAGTY; (SEQ ID NO: 53)), в пределах аминокислот 15-44 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 13-24 Тау-полипептида или в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида (где аминокислоты 15-24 Тау-полипептида следующие: AGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 51)) включает а) область легкой цепи, содержащую i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; ii) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, содержащую i) один, два или три участка CDR, выбранных из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и ii) каркасную область гуманизированной тяжелой цепи.

В некоторых примерах антитело содержит а) область легкой цепи, включающую i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и (iv) каркасную область гуманизированной легкой цепи; и b) область тяжелой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и (iv) FR4 гуманизированной тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, включающую один, два или три участка CDR тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей: SEQ ID NO: 4, 5 и 6; и одна, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизованными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизованной тяжелой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; FR2 гуманизованной тяжелой цепи; участок CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; FR3 гуманизованной тяжелой цепи; участок CDR3, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и FR4 гуманизованной тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, включающую один, два или три участка CDR легкой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NOs: 1, 2 и 3; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизованными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит переменную область легкой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизованной легкой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; FR2 гуманизованной легкой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; FR3 гуманизованной легкой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и FR4 гуманизованной легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, включающую один, два или три участка CDR тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NO: 10, 11 и 12; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизованными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизованной тяжелой цепи; участок CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; FR2; гуманизованной тяжелой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; FR3 гуманизованной тяжелой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и FR4 гуманизованной тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по изобретению содержит переменную область легкой цепи, включающую один, два или три участка CDR легкой цепи, имеющих полипептидную последовательность, выбранную из одной или более последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9; и одну, две, три или четыре FR области, которые являются гуманизованными. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит переменную область легкой цепи, которая включает, по порядку, от N-конца к C-концу: FR1 гуманизованной легкой цепи; CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; FR2 гуманизованной легкой цепи; CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; FR3 гуманизованной легкой цепи; CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и FR4 гуманизованной легкой цепи.

V_H и V_L аминокислотные последовательности антитела IPN001 изображены на фиг. 1A и 1B. CDR (по номенклатуре Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Аминокислотные последовательности V_H и V_L антитела IPN002 показаны на фиг. 2A и 2B. CDR (по номенклатуре Kabat) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

SEQ ID NO: 1-12 представлены ниже:

RSSQTILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:1);
 KVSKRFS (SEQ ID NO:2);
 FQGSLPWA (SEQ ID NO:3);
 SYGMS (SEQ ID NO:4);
 TISSGSRTYFPDSVKG (SEQ ID NO:5);
 TWDGAMDY (SEQ ID NO:6);
 KSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:7);
 KVSNRFS (SEQ ID NO:8);
 FQGSLPWA (SEQ ID NO:9);
 KYGMS (SEQ ID NO:10);
 TISSGSRTYYPDSVKG (SEQ ID NO:11);
 SWDGAMDY (SEQ ID NO:12).

Антитело к Тау по изобретению может содержать переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 1B и представленной в SEQ ID NO: 13.

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 1А и представленной в SEQ ID NO: 14.

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 2В и представленной в SEQ ID NO: 15.

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 2А и представленной в SEQ ID NO: 16.

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 9 (V_H вариант 1).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 10 (V_H вариант 2).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 11 (V_H вариант 3).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 12 (V_H вариант 4).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 13 (V_K вариант 1).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 14 (V_K вариант 2).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 15 (V_K вариант 3).

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности, изображенной на фиг. 16 (V_K вариант 4).

Антитело к Тау по изобретению может иметь вариабельную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен в каркасной области (FR) по сравнению с аминокислотными последовательностями FR исходного (первичного) антитела IPN002, изображенных в табл. 2.

Таблица 2

V _H варианты					
Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	VH Вариант 1	VH Вариант 2	VH Вариант 3	VH Вариант 4
FR1					
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
FR2					
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
FR3					
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
FR4					
108	S	S	T	T	T

Например, антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую замену H→Q в положении аминокислоты 3 в V_H FR1 и/или замену K→R в положении аминокислоты 19 в V_H FR1.

В другом примере антитело к Тау по изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, включающую замену T→A в положении аминокислоты 40 в V_H FR2 и/или замену D→G в положении аминокислоты 42 в V_H FR2 и/или замену R→G в положении аминокислоты 44 в V_H FR2.

В другом примере антитело к Тау по изобретению может иметь вариабельную область тяжелой це-

пи, содержащую замену Q→R в положении 66 в V_H FR3, и/или замену S→N в положении аминокислоты 83 в V_H FR3, и/или замену L→S в положении аминокислоты 85 в V_H FR3, и/или замену K→R в положении аминокислоты 86 в FR3 и/или замену S→A в положении аминокислоты 87 в V_H FR3 и/или замену S→A в положении аминокислоты 93 в V_H FR3.

Еще в одном примере антитело к Тау по изобретению может иметь вариательную область тяжелой цепи, содержащую замену S→T в положении аминокислоты 108 в V_H FR4.

В некоторых случаях выделенное антитело к Тау по изобретению может содержать V_H область, содержащую, по порядку, от N-конца к C-концу: EVX₁LVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFSFS (SEQ ID NO: 83); участок V_H CDR1, показанный на фиг. 2А; WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 84); V_H CDR2, показанный на фиг. 2А; RFTISRDNANTLYLQMX₂SX₃X₄X₅EDTAMYCYX₆I (SEQ ID NO: 85); V_H CDR3, показанный на фиг. 2А; WGQGTGX7VTVSS (SEQ ID NO: 86), где X₁ обозначает H или Q; X₂ обозначает S или N; X₃ обозначает S или L; X₄ обозначает K или R; X₅ обозначает S или A; X₆ обозначает S или A и X₇ обозначает S или T.

Антитело к Тау по изобретению может содержать вариательную область легкой цепи, включающую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен в каркасной области (FR) по сравнению с аминокислотными последовательностями FR исходного антитела IPN002, показанные в табл. 3.

Таблица 3

Vk варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	Vk Вариант 1	Vk Вариант 2	Vk Вариант 3	Vk Вариант 4
FR1					
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
FR2					
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
FR3					
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
FR4					
104	L	V	V	V	V

Например, антитело к Тау по изобретению может иметь вариательную область легкой цепи, содержащую замену L→V в аминокислотном положении 3 в V_L FR1, и/или замену T→S в положении аминокислоты 7 в V_L FR1, и/или замену S→T в положении аминокислоты 14 в V_L FR1, и/или замену D→Q в положении аминокислоты 17 в V_L FR1, и/или замену Q→P в положении аминокислоты 18 в V_L FR1.

В другом примере антитело к Тау по изобретению может иметь вариательную область легкой цепи, содержащую замену K→Q в положении аминокислоты 45 в V_L FR2 и/или замену V→I в положении аминокислоты 48 V_L FR2.

В другом примере антитело к Тау по изобретению может иметь вариательную область легкой цепи, содержащую замену L→V в положении аминокислоты 83 в V_L FR3 и/или замену T→V в положении аминокислоты 85 в V_L FR3.

В другом примере антитело к Тау по изобретению может иметь вариательную область легкой цепи, содержащую замену L→V в положении аминокислоты 104 в V_L FR4.

В некоторых случаях выделенное антитело к Тау по изобретению может содержать V_L область, содержащую, по порядку, от N-конца к C-концу: DVX₁MTQSPSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO: 54); участок V_L CDR1, показанный на фиг. 2B; WYLQKPGQSPQLLX₂Y (SEQ ID NO: 55); V_L CDR2, показанный на фиг. 2B; GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVYGX₃YYC (SEQ ID NO: 56); V_L CDR3, показанный на фиг. 2B; FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 57); где X₁ обозначает L или V; X₂ обозначает V или I и X₃ обозначает T или V.

В некоторых случаях антитело к Тау по настоящему изобретению содержит:

- V_H вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 9; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 13;
- V_H вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 9; и Vk вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 14;
- V_H вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 9; и Vk вариант 3, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 15;
- V_H вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 9; и Vk вариант 4, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 16;
- V_H вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 10; и Vk вариант 1, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 13;
- V_H вариант 2, содержащий аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 10; и Vk

ласть FR3 легкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и область FR4 легкой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 до примерно 10 аа, от примерно 10 до примерно 15 аа, от примерно 15 до примерно 20 аа, от примерно 20 до примерно 25 аа, от примерно 25 до примерно 30 аа, от примерно 30 до примерно 35 аа, от примерно 35 до примерно 40 аа, от примерно 40 до примерно 45 аа или от примерно 45 до примерно 50 аа.

Согласно некоторым вариантам антитела по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 легкой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; область FR2 легкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; область FR3 легкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; необязательно, область FR4 легкой цепи; линкерную область; необязательно, область FR1 тяжелой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:10; область FR2 тяжелой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; область FR3 тяжелой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и область FR4 тяжелой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 до примерно 10 аа, от примерно 10 до примерно 15 аа, от примерно 15 до примерно 20 аа, от примерно 20 до примерно 25 аа, от примерно 25 до примерно 30 аа, от примерно 30 до примерно 35 аа, от примерно 35 до примерно 40 аа, от примерно 40 до примерно 45 аа или от примерно 45 до примерно 50 аа.

Согласно некоторым вариантам антитела по изобретению содержит, по порядку, от N-конца к C-концу: область FR1 тяжелой цепи; домен (участок) CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; область FR2 тяжелой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; область FR3 тяжелой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; необязательно, область FR4 тяжелой цепи; линкер; необязательно, область FR1 легкой цепи; домен CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID:7; область FR2 легкой цепи; домен CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; область FR3 легкой цепи; домен CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и область FR4 легкой цепи. Согласно некоторым из этих вариантов одна или более FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Согласно некоторым из этих вариантов каждая из этих FR областей представляет собой гуманизованную FR область. Линкерная область может иметь длину от примерно 5 до примерно 50 аминокислот, например, длину от примерно 5 до примерно 10 аа, от примерно 10 до примерно 15 аа, от примерно 15 до примерно 20 аа, от примерно 20 до примерно 25 аа, от примерно 25 до примерно 30 аа, от примерно 30 до примерно 35 аа, от примерно 35 до примерно 40 аа, от примерно 40 до примерно 45 аа или от примерно 45 до примерно 50 аа.

Линкеры, пригодные для применения в последовательностях антитела по изобретению, включают "гибкие линкеры". Линкерные молекулы, в случае их присутствия, обычно имеют длину, достаточную для того, чтобы обеспечить некоторое свободное движение связанных областей друг относительно друга. Длина линкерных молекул обычно составляет примерно 6-50 атомов. Линкерными молекулами могут также являться, например, олигомеры арилацетилена, этиленгликоля, содержащие 2-10 мономерных единиц, диамины, аминокислоты или их комбинации. В свете настоящего изобретения могут применяться другие линкерные молекулы, которые могут связываться с полипептидами.

Соответствующие линкеры можно легко выбрать, они могут быть любой подходящей длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 до 15 аминокислот, от 3 до 12 аминокислот, включая от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот и могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Примеры гибких линкеров включают полимеры глицина (G_n), полимеры глицин-серин (включая, например, $(GS)_n$, $GSGGS_n$ (SEQ ID NO: 58) и $GGGS_n$ (SEQ ID NO: 59), где n обозначает целое число, по меньшей мере один), полимеры глицин-аланин, полимеры аланин-серин и другие гибкие линкеры, известные из уровня техники. Полимеры глицина и полимеры глицин-серин представляют интерес, так как обе эти аминокислоты являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтрального ограничителя между компонентами. Полимеры глицина представляют особый интерес, так как значения торсионных углов (ϕ и ψ) глицина распределены по значительно большему пространству (доступ глицина к значительно большему ϕ -пси пространству), чем даже у аланина, и глицин имеет значительно меньшие ограничения, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Примеры гибких линкеров включают, но без огра-

ничения, GGSG (SEQ ID NO: 60), GGSGG (SEQ ID NO: 61), GSGSG (SEQ ID NO: 62), GSGGG (SEQ ID NO: 63), GGSAG (SEQ ID NO: 64), GSSAG (SEQ ID NO: 65) и т.п. Специалист в данной области техники признает, что конструкция пептида, конъюгированного с любыми элементами, описанными выше, может включать линкеры, которые являются целиком или частично гибкими линкерами, так чтобы линкер мог включать гибкий линкер, а также один или более участков, которые придают менее гибкую структуру.

В некоторых случаях выделенное антитело по изобретению представляет собой фрагмент антитела Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'. Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается выделенное антитело, причем антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab', и это антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида с антителом, которое содержит а) область легкой цепи, включающей (i) V_L CDR1 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) а V_L CDR2 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) V_L CDR3 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и b) область тяжелой цепи, включающей (i) V_H CDR1 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) V_H CDR2 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) V_H CDR3 участок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. В некоторых из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизованных V_L каркасных области, описанных выше. В некоторых из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизованных V_H каркасных области, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению представляет собой scFv антитело. Согласно некоторым вариантам антитело к Тау по настоящему изобретению содержит мультимеры scFv. Например, согласно некоторым вариантам антитело по изобретению представляет собой димер scFv (например, содержит два tandemных повтора scFv (scFv₂)), тример scFv (например, содержит три tandemных повтора scFv (scFv₃)), тетрамер scFv (например, содержит четыре tandemных повтора scFv (scFv₄)) или представляет собой мультимер, содержащий более четырех scFv (например, в tandemе). Мономеры scFv могут связываться в tandem с помощью линкеров длиной от примерно 2 до примерно 10 аминокислот (aa), например, длиной 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa или 10 aa. Подходящие линкеры включают, например, (Gly)_x, где x обозначает целое число от 2 до 10. Другие подходящие линкеры представляют собой линкеры, обсуждавшиеся выше. Согласно некоторым вариантам каждый из scFv мономеров в обсуждаемом scFv мультимере является гуманизованным, как описано выше.

В некоторых примерах антитело по изобретению содержит константную область иммуноглобулина (например, Fc область). Fc область, если таковая присутствует, может представлять собой человеческую Fc область. Если константные области присутствуют, то антитело может содержать константные области как легкой, так и тяжелой цепей. Подходящие константные области включают CH1, шарнирную, CH2, CH3 и CH4 области. Антитела по настоящему описанию включают антитела, содержащие константные области всех типов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Примером подходящей Fc области тяжелой цепи является Fc область человеческого изотипа IgG1 Fc. В некоторых случаях область тяжелой цепи является областью изотипа IgG4. Согласно некоторым из этих вариантов шарнирная область содержит замену S241P. См., например, Angal et al. (1993), Mol. Immunol. 30:105. Константные области легкой цепи могут представлять собой цепи лямбда или каппа иммуноглобулинов. Антитело по изобретению (например, гуманизованное антитело) может содержать последовательности более чем одного класса или изотипа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, у которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей связаны посредством спейсера.

Согласно некоторым вариантам в настоящем изобретении предусматривается выделенное антитело, которое содержит константную область человеческой легкой цепи и константную область человеческой тяжелой цепи, и это выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом в N-концевой области Тау-полипептида с антителом, содержащим а) область легкой цепи, содержащую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и b) область тяжелой цепи, содержащую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизованные V_L каркасные области, описанные выше. Согласно некоторым из этих вариантов выделенное антитело содержит одну, две, три или четыре гуманизованные V_H каркасные области, описанные выше.

Антитело по изобретению может содержать свободную тиольную (-SH) группу на карбоксильном конце, где свободная тиольная группа может применяться для связывания антитела со вторым полипептидом (например, другим антителом, включая антитело по изобретению), каркасной структурой, носителем и т.д.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит одну или более неприродных аминокислот. Согласно некоторым вариантам не кодируемые генетически неприродные аминокислоты, содержат карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, гидразиновую группу, гидразидную группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Подходящие неприродные аминокислоты описаны, например, в патенте США № 7632924. Включение неприродной аминокислоты может обеспечить связывание с полимером, вторым полипептидом, каркасной структурой и т.д. Например, антитело по изобретению, связанное с водорастворимым полимером, можно получать реакцией водорастворимого полимера (например, PEG (ПЭГ)), который содержит карбонильную группу, с антителом, причем антитело содержит не кодируемую естественным образом (генетически) аминокислоту, которая содержит аминооксигруппу, гидразиновую, гидразидную или семикарбазидную группу. В другом примере антитело по изобретению, связанное с водорастворимым полимером, можно получать по реакции антитела по изобретению, которое содержит алкинсодержащую аминокислоту, с водорастворимым полимером (например, PEG), содержащим азидную группу; согласно некоторым вариантам азидная или алкиновая группа связывается с молекулой PEG за счет амидной связи. Выражение "не кодируемая генетически аминокислота" относится к аминокислоте, которая не представляет собой одну из 20 обычных (важнейших) аминокислот, или пирролизин, или селеноцистеин. Другие термины, которые можно употреблять в качестве синонимов выражения "не кодируемая генетически аминокислота", включают выражения "неприродная аминокислота", "ненатуральная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и их различные варианты с дефисом или без дефиса. Термин "аминокислота, не кодируемая генетически" включает также, но без ограничения, аминокислоты, которые получают модификацией (например, посредством посттрансляционных модификаций) генетически кодируемой аминокислоты (включая, но без ограничения, 20 обычных аминокислот или пирролизина и селеноцистеина), но они сами, естественным путем, не включаются в растущую полипептидную цепь с использованием комплекса трансляции. Примеры таких неприродных аминокислот включают, но без ограничения, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано (например, ковалентной связью) с полимером (например, полимером, отличным от полипептида). Подходящие полипептиды включают, например, биосовместимые полимеры и водорастворимые биосовместимые полимеры. Подходящие полимеры включают синтетические полимеры и природные (натуральные) полимеры. Подходящие полимеры включают, например, замещенные или незамещенные линейные или разветвленные полиалкилены, полиалкенилены или полиоксиалкенилены или линейные или разветвленные полисахариды, например, гомо- или гетерополисахариды. Подходящие полимеры включают, например, сополимер этилена с виниловым спиртом (обычно известный под международным непатентованным названием EVON или под торговой маркой (коммерческим названием) EVAL); полибутилметакрилат; полигидроксивалерат; поли-L-молочную кислоту; поликапролактон; полилактид-гликолид; полигидроксипропанат; сополимер гидроксибутирата и валерата; полидиоксанон; полиортоэфир; полиангидрид; полиглицолевую кислоту; поли-D,L-молочную кислоту; сополимер гликолевой кислоты и триметиленкарбоната; полифосфозфир; полифосфозфир-уретан; полиаминокислоты; цианоакрилаты; политриметиленкарбонат; полииминокарбонат; сополимеры простых и сложных эфиров (например, сополимеры полиэтиленоксид-полимолочная кислота) (PEO/PLA); полиалкиленоксалаты; полифосфазены; биомолекулы, например, такие как фибрин, фибриноген, целлюлоза, крахмал, коллаген и гиалуроновая кислота; полиуретаны; силиконы; сложные полиэферы; полиолефины; полиизобутилен и сополимеры этилена с альфа-олефинами; акриловые полимеры и сополимеры; полимеры и сополимеры винилгалогенидов, такие как поливинилхлорид; полимеры простых виниловых эфиров, например поливинилметилэфир; поливинилиденгалогениды, например поливинилиденфторид и поливинилиденхлорид; полиакрилонитрил; поливинилкетоны; полимеры винил-ароматических соединений, например полистирол; поливиниловые эфиры, например поливинилацетат; сополимеры виниловых мономеров друг с другом и олефинами, например, такие как сополимеры этилена с метилметакрилатом, сополимеры акрилонитрила со стиролом, ABS (АБС)-пластики и сополимеры этилена с винилацетатом; полиамиды, например нейлон Nylon 66 и поликапролактон; алкидные смолы; поликарбонаты; полиоксиметилены; полиимины; простые полиэфиры; эпоксидные смолы; полиуретаны; вискозное (искусственное) волокно; искусственное волокно-триацетат; целлюлозу; ацетат целлюлозы; бутират целлюлозы; ацетат-бутират целлюлозы; целлофан; нитрат целлюлозы; пропионат целлюлозы; простые эфиры целлюлозы; аморфный тефлон; полиэтиленгликоль и карбоксиметилцеллюлозу.

Соответствующие синтетические полимеры включают незамещенные и замещенные линейные и разветвленные полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт и их производные, например замещенный полиэтиленгликоль, например метоксиполиэтиленгликоль и их производные. Соответствующие природные полимеры включают, например, альбумин, амилозу, декстран, гликоген и их производные.

Средняя молекулярная масса подходящих полимеров может находиться в интервале от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да или от 25000 до 40000 Да. Например, согласно некоторым вариантам, если антитело по изобретению содержит полимер полиэтиленгликоль (PEG) или метоксиполиэтиленгликоль, то молекулярная масса полимеров PEG или метоксиполиэтиленгликоля может быть в интервале от примерно 0.5 до 1 кДа, от примерно 1 до 5 кДа, от 5 до 10 кДа, от 10 до 25 кДа, от 25 до 40 кДа или от 40 до 60 кДа.

Как отмечается выше, согласно некоторым вариантам, антитело по изобретению связано ковалентной связью с полимером PEG. Согласно некоторым вариантам scFv мультимер по изобретению ковалентно связан с полимером PEG. См., например, Albrecht et al. (2006), J. Immunol. Methods 310:100. Способы и реагенты, применимые для пегилирования белка в уровне техники, можно найти, например, в патенте США № 5849860. Полимер PEG, применимый для конъюгации с белком, как правило, растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$, где R обозначает водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа, и где n обозначает целое число от 1 до 1000. Если R обозначает защитную группу, она обычно содержит от 1 до 8 углеродных атомов.

Молекула PEG, конъюгированная с антителом по изобретению, может быть линейной. Молекула PEG, конъюгированная с белком по изобретению, также может быть разветвленной. Разветвленные PEG производные, например, описаны в патенте США № 5643575, "звездообразные-PEG" и сильно разветвленные полимеры PEG описаны, например, в каталоге Shearwater Polymers, Inc. catalog "Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998". Звездообразные полимеры PEG описаны в уровне техники, например в патенте США № 6046305.

Антитело по изобретению может быть гликозилированным, например антитело по изобретению может содержать ковалентно связанную углеводную или полисахаридную группу. Гликозилирование антител обычно идет либо по N-связи, либо по O-связи. N-связанное гликозилирование относится к связыванию углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X обозначает любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой распознающие последовательности для ферментативного связывания углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к связыванию одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, с гидроксикаминокислотой, обычно с серином или треонином, хотя могут также применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление к антителу сайтов гликозилирования удобно проводить, изменяя аминокислотную последовательность таким образом, чтобы она содержала одну или более вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение можно также осуществлять посредством добавления одного или более или замены на один или более остатков серина или треонина к (или в) последовательности исходного антитела (для O-связанных сайтов гликозилирования). Аналогично, удаление сайтов гликозилирования можно осуществлять, изменяя аминокислотную последовательность в нативных сайтах гликозилирования антитела.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению содержит рентгеноконтрастную ("контрастную, радиоизотопную, непроницаемую (для излучения)") метку, например метку, которую легко визуализировать с помощью рентгеновских лучей. Рентгеноконтрастные материалы хорошо известны специалисту в данной области техники. Обычно рентгеноконтрастные материалы включают йодистые, бромистые соли или соли бария. Известны также другие рентгеноконтрастные (контрастные, радиоизотопные) материалы, они включают, но без ограничения, органические соединения висмута (см., например, патент США № 5939045), рентгеноконтрастные полиуретаны (см. патент США № 5346981), композиты, содержащие органовисмут (см., например, патент США № 5256334), мультимерные рентгеноконтрастные комплексы бария (см., например, патент США № 4866132) и т.п.

Антитело по изобретению может быть ковалентно связано со второй частицей (например, липидом, полипептидом, отличным от антитела по изобретению, синтетическим полимером, углеводом и т.п.) с применением, например, глутаральдегида, гомобифункционального сшивающего агента (кросслинкера). Глутаральдегид сшивает полипептиды по аминок группам. Гомобифункциональные сшивающие агенты (например, гомобифункциональный имидоэфир, гомобифункциональный N-гидроксисукцинимидиловый (NHS) эфир или содержащий сульфгидрильную группу гомобифункциональный реакционноспособный сшивающий агент) содержат два или более идентичных реакционноспособных фрагмента и могут применяться в одностадийной реакции, в которой сшивающий агент добавляют к раствору, содержащему смесь связывающихся полипептидов. Гомобифункциональные NHS эфир и имидоэфиры сшивают полипептиды, содержащие аминок группу. В слабоосновной среде (pH) имидоэфиры реагируют только с первичными аминами с образованием имидоамидов, и это не влияет на общий заряд сшитых полипептидов. Гомобифункциональные реакционноспособные сульфгидрильные сшивающие агенты включают бисмалеимиодогексан (BMH), 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (DFDNB) и 1,4-ди-(3',2'-пиридилдитио)-пропионамидобутан (DPDPB).

Гетеробифункциональные сшивающие агенты содержат две или более различные реакционноспо-

собные функциональные группы (например, реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную сульфгидрильную группу) и сшиваются с одним из полипептидов по amino- или сульфгидрильной группе, затем реагируют с другим полипептидом по непрореагировавшей группе. Имеется ряд гетеробифункциональных сшивающих агентов, содержащих галогенацетильные группы, пиридилдисульфидные группы. Карбодимиды представляют собой классический пример гетеробифункциональных сшивающих агентов для связывания карбоксильных соединений с аминами с образованием амидной связи.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению может быть иммобилизовано на твердой подложке (носителе). Подходящие носители хорошо известны в уровне техники и включают, среди прочих, коммерчески доступные материалы для колонок (насадки), полистирольные гранулы (шарики), латексные гранулы, магнитные гранулы, коллоидные частицы металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембраны, листы, дурациты, лунки реакционных планшетов (например, многолуночных планшетов), пластиковые трубки и т.д. Твердая подложка (твердый носитель) может содержать любое из множества веществ, включая, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, натуральную и модифицированную целлюлозу, полиакриламиды, агарозу и магнетит. Соответствующие методы иммобилизации антитела по изобретению на твердом носителе хорошо известны и включают, но без ограничения, ионное, гидрофобное, ковалентное взаимодействие и т.п. Твердые носители могут быть растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам соответствующий твердый носитель обычно нерастворим в водном растворе.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению включает детектируемую метку. Подходящие детектируемые метки включают любую композицию (состав), которую можно обнаруживать спектроскопическим, фотохимическим, биохимическим, иммунохимическим, электрическим, оптическим или химическим методом. Соответствующие метки включают, но без ограничения, магнитные гранулы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, флуоресцеин изотиоцианат, тхасский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок и т.п.), радиоизотопные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие, применяемые обычно в твердофазном иммуоферментном анализе (ELISA, ИФА)), и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или окрашенные стеклянные или пластиковые (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т.д.) гранулы.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению включает контрастный агент или радиоизотоп, где контрастный агент или радиоизотоп представляет собой такой агент или изотоп, который пригоден для визуализации, например, в исследованиях, проводимых на людях. Неограничивающие примеры меток включают радиоизотоп, например, такой как ^{123}I (йод), ^{18}F (фтор), ^{99}Tc (технеций), ^{111}In (индий) и ^{67}Ga (галлий), и контрастный агент, например, такой как гадолиний (Gd), диспрозий и железо. Радиоактивные изотопы Gd (^{153}Gd) также доступны и применяются для визуализации на нечеловеческих млекопитающих. Антитело по изобретению можно метить стандартными методами. Например, антитело по изобретению можно йодировать с применением хлорамина Т или 1,3,4,6-тетрахлор-3а,6а-дифенилгликурила. Для фторирования вводят фтор в антитело по изобретению в процессе синтеза реакцией замещения фторид-иона. Обзоры синтеза белков с такими радиоизотопами см. Muller-Gartner, H., *TIB Tech.*, 16:122-130 (1998) и Saji, H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 16(2):209-244 (1999). Антитело по изобретению можно также метить контрастным агентом стандартными методами. Например, антитело по изобретению можно метить с помощью Gd, конъюгируя низкомолекулярные хелаты Gd, такие как хелат Gd с диэтилендиаминпентауксусной кислотой (GdDTPA) или хелат Gd с тетраазациклододекантетрауксусной кислотой (GdDOTA), с антителом. См. Caravan et al., *Chem. Rev.* 99:2293-2352 (1999) и Lauffer et al., *J. Magn. Reson. Imaging*, 3:11-16 (1985). Антитело по изобретению можно метить с помощью Gd, например, конъюгацией хелатов полилизин-Gd с антителом, см., например, Curtet et al., *Invest. Radiol.*, 33(10):752-761 (1998), или же антитело по изобретению можно метить гадолинием (Gd), инкубируя парамагнитные полимеризованные липосомы, которые включают хелат Gd с липидом, с авидином и биотинилированным антителом. См., например, Sipkins et al., *Nature Med.*, 4:623-626 (1998).

Подходящие флуоресцентные белки, которые можно связывать с антителом по изобретению, включают, но без ограничения, зеленый флуоресцентный белок, выделенный из медузы *Aequoria Victoria*, или его мутант или производное, например, описанные в патентах США № 6066476; 6020192; 5985577; 5976796; 5968750; 5968738; 5958713; 5919445; 5874304; например, улучшенный GFP, многие такие GFP являются коммерчески доступными, например, от компании Clontech, Inc.; красный флуоресцентный белок; желтый флуоресцентный белок; любой из ряда флуоресцентных и цветных белков из кишечнорастворимых животных класса Anthozoa (Коралловые полипы), описанных, например, в публикации Matz et al. (1999), *Nature Biotechnol.* 17:969-973; и т.п.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано (ковалентной или нековалентной связью) с партнером, например с лигандом; эпитопной меткой (тегом); пептидом; белком, отличным от антитела; и т.п. Соответствующие партнеры по связыванию включают пептиды и полипептиды, которые придают повышенную стабильность *in vivo* (например, повышенный период полужизни в сыворотке

крови); способствуют очистке (обеспечивают простую очистку), например (His)_n, например 6His и т.п.; способствуют секреции гибридного (химерного) белка клеткой; предоставляют эпитопную метку, например GST, гемагглютинин (HA; например, YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 71), FLAG (например, DYKDDDDK; SEQ ID NO: 69), с-мус (e.g., EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 68, и т.п.; предоставляют детектируемый сигнал, например, фермент, который катализирует получение детектируемого продукта (например, β-галактозидаза, люцифераза), или белок, который можно обнаруживать сам по себе, например зеленый флуоресцентный белок; красный флуоресцентный белок; желтый флуоресцентный белок и т.д.; обеспечивает мультимеризацию, например, предоставляет домен, способный к мультимеризации, например, такой как Fc участок иммуноглобулина; и т.п.

Объединение (связывание) может включать также аффинный домен, включающий пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать с партнером по связыванию, например, таким, который иммобилизован на твердом носителе, применимом для идентификации или очистки. Последовательные одиночные аминокислоты, такие как гистидин, связанные с белком, можно применять для одностадийной очистки гибридного белка посредством высокоаффинного связывания с полимером (насадкой) в колонке, таким как никель сепароза. Примеры аффинных доменов включают His5 (HNNHN) (SEQ ID NO: 66), HisX6 (HNNHNH) (SEQ ID NO: 67), с-мус (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 68), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 69), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO: 70), гемагглютинин, например, HA Tag (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 71), глутатион-8-трансферазу (GST), тиоредоксин, домен, связывающий целлюлозу, RYIRS (SEQ ID NO: 72), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO: 73), хитин-связывающий домен, S-пептид, T7 пептид, SH2 домен, C-концевой домен РНК-полимеразы, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO: 74), металл-связывающие домены, например цинк-связывающие домены или кальций-связывающие домены, например кальмодулин, тропонин С, кальциневрин В, легкая цепь миозина, реверин, S-модулин, визинин, VILIP, нейрокальцин, гипокальцин, фреквенин, кальтрактин, большая субъединица кальпаина, S100 белки, парвальбумин, кальбиндин D9K, кальбиндин D28K и кальретинин, интеины, биотин, стрептавидин, MyoD, последовательности "лейциновой застежки-молнии" и мальтоза-связывающий белок.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению связано с полипептидом, который связан с эндогенным рецептором гематоэнцефалического барьера (BBB, ГЭБ). Связывание антитела субъекта с полипептидом, который связывается с эндогенным BBB рецептором, способствует проникновению через BBB, например в методе лечения субъекта (см. ниже), включающем введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по изобретению. Соответствующие полипептиды, которые связываются с эндогенным BBB рецептором, включают антитела, например моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с эндогенным BBB рецептором. Применимые эндогенные BBB рецепторы включают, но без ограничения, инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, рецептор лептина, рецептор липопротеинов и рецептор инсулиноподобного фактора роста. См., например, опубликованную заявку на патент США № 2009/0156498.

Например, антитело к Тау по изобретению может представлять собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, который специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде (например, линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, например, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида или в пределах аминокислот с 9 до 18 Тау-полипептида); и второй антигенсвязывающий участок, который связывает эндогенный BBB рецептор. Например, в некоторых примерах антитело к Тау по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, который специфически связывает эпитоп в Тау-полипептиде (например, линейный эпитоп на аминоконцевом (N-концевом) участке Тау-полипептида, например, в пределах аминокислот 1-25 Тау-полипептида, в пределах аминокислот 1-18 Тау-полипептида или в пределах аминокислот с 9 до 18 Тау-полипептида); и второй антигенсвязывающий участок, который связывает рецептор трансферрина.

Например, антитело к Тау по настоящему изобретению может быть связано (соединено) с пептидом, который способствует транспорту через BBB, причем этот пептид имеет длину от примерно 15 аминокислот до примерно 25 аминокислот и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 85% идентична аминокислотной последовательности одного из следующих пептидов:

Angiopep-1 (TFFYGGCRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO: 75);
 Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO: 76);
 цис-Angiopep-2 (CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY; SEQ ID NO: 77);
 Angiopep-2-цис (TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC; SEQ ID NO: 78);
 и фрагмент аprotинина (TFVYGGCRAKRNNFKS; SEQ ID NO: 79),
 см., например, опубликованные заявки на патент США № 2011/0288011 и 2009/0016959.

Пептид, который способствует транспорту через BBB, можно связывать с N-концом области легкой цепи антитела к Тау, с C-концом области легкой цепи антитела к Тау, с N-концом области тяжелой цепи антитела к Тау, с C-концом области тяжелой цепи антитела к Тау, с N-концом одноцепочечного антитела к Тау по изобретению, с C-концом одноцепочечного антитела к Тау по изобретению и т.д.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению представляет собой модификацию посредством полиаминов. Модификация антитела по изобретению с помощью полиаминов повышает проницаемость ВВВ для модифицированного антитела. Антитело по изобретению может быть модифицировано полиаминами, которые являются либо природными, либо синтетическими. См., например, патент США № 5670477. Применимые природные (натуральные) полиамины включают путресцин, спермидин, спермин, 1,3-диаминопропан, норспермидин, син-гомоспермидин, термин, термоспермин, кальдопентамин, гомокальдопентамин и канавалмин. Чаще всего применяют путресцин, спермидин и спермин. Синтетические полиамины соответствуют эмпирической формуле $C_xH_yN_z$, они могут быть циклическими или ациклическими, разветвленными или неразветвленными, содержать углеводородные цепи из 3-12 углеродных атомов, которые также включают 1-6 групп NR или N(R)₂, где R обозначает H, (C₁-C₄)алкил, фенил или бензил. Полиамины можно связывать с антителом любым стандартным методом сшивания.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению модифицируют таким образом, чтобы оно включало углеводный фрагмент, причем углеводный фрагмент может быть ковалентно связан с антителом. Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению модифицируют таким образом, чтобы оно включало липидный фрагмент, причем липидный фрагмент может быть ковалентно связан с антителом. Подходящие липидные фрагменты включают, например, N-ацильную группу кислоты жирного ряда, например, такую как N-лауроил, N-олеоил, и т.д.; амин жирного ряда, например, такой как додециламин, олеиламин и т.д.; C₃-C₁₆-алифатический липид с длинной цепью и т.п. См., например, патент США № 6638513. Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению заключено в липосому.

Способы получения антитела по изобретению.

Антитело по изобретению можно получать любым известным способом, например обычными методами синтеза белков; методами рекомбинантной ДНК и т.д.

Если антитело по изобретению представляет собой одноцепочечный полипептид, его можно синтезировать стандартными методами пептидного синтеза. Если полипептид синтезируют химическими методами, синтез может осуществляться в жидкой фазе (жидкофазный синтез) или в твердой фазе (твердофазный синтез). Твердофазный полипептидный синтез (SPPS), в процессе которого C-концевая аминокислота связывается с нерастворимым носителем с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот в последовательности, является примером адекватного, подходящего для этой цели метода химического синтеза антитела по изобретению. Различные формы SPPS, такие как Fmoc и Boc, применимы для синтеза антитела по изобретению. Методы твердофазного синтеза описаны в публикациях: Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; p. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); и Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6:3-10 и Camarero J.A et al. 2005, *Protein Pept Lett.* 12:723-8. Коротко говоря, к небольшим нерастворимым пористым гранулам (шарикам) прибавляют (присоединяют) функциональные единицы, на которых строят пептидную цепь. В ходе многократного повторения циклов связывания/депротекции (присоединения/снятия защиты) свободная N-концевая аминокислотная группа, иммобилизованного на твердой фазе, связывается с N-защищенным аминокислотным звеном. Это звено затем депротектируют, высвобождая новую N-концевую аминокислотную группу, с которой может связываться следующая аминокислота. Пептид остается иммобилизованным на твердой фазе и отфильтровывается перед отщеплением.

Для получения антитела по изобретению можно применять стандартные методы рекомбинантной ДНК. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепи, обязательно связанные с константными областями, встраивают в экспрессионный вектор. Легкую и тяжелую цепи можно клонировать в один и тот же экспрессионный вектор или в разные экспрессионные векторы. Сегменты ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулинов, функционально связаны с регуляторными (контрольными) последовательностями в экспрессионном(ых) векторе(ах), что гарантирует экспрессию полипептидов иммуноглобулинов. Последовательности, регулирующие экспрессию (регуляторные элементы экспрессии) включают, но без ограничения, промоторы (например, природно связанные или гетерологичные промоторы), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Регуляторные последовательности (последовательности, регулирующие экспрессию) могут представлять собой промоторную систему эукариот в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева (например, клетки COS или СНО). После того, как вектор был введен в клетку-хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для высокоуровневой экспрессии нуклеотидных последовательностей и сбора и очистки антител.

Вследствие вырожденности генетического кода каждую аминокислотную последовательность иммуноглобулина могут кодировать несколько нуклеотидных последовательностей. Нужные нуклеотидные последовательности можно получать *de novo* (с самого начала, полным) твердофазным синтезом ДНК или мутагенезом, с помощью полимеразной цепной реакции (PCR), ранее полученного варианта нужного полинуклеотида. Олигонуклеотид-опосредуемый мутагенез является примером подходящего, адекватного метода получения вариантов ДНК целевого полипептида, содержащего замену, делецию или инсерцию (вставку). См. Adelman et al., *DNA* 2:183 (1983). Коротко говоря, ДНК целевого полипептида изме-

няют посредством гибридизации олигонуклеотида, кодирующего нужную мутацию, с одонитевой ДНК-матрицей. После гибридизации используют ДНК-полимеразу для синтеза полной второй комплементарной нити матрицы, которая включает олигонуклеотидный праймер, и кодирует выбранное изменение в ДНК целевого полипептида.

Подходящие экспрессионные векторы обычно могут реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры (например, резистентности к ампициллину, резистентности к гиромидину, резистентности к тетрациклину, резистентности к канамицину или резистентности к неомицину), позволяющие детектировать клетки, трансформируемые заданными ДНК-последовательностями.

Escherichia coli являются примером прокариотической клетки-хозяина, которую можно использовать для клонирования полинуклеотида, кодирующего антитело по соединению. Другие микроорганизмы-хозяева, пригодные для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы (*Salmonella*), серрации (*Serratia*) и различные виды псевдомонад (*Pseudomonas*). В этих прокариотических хозяевах также можно создавать экспрессионные векторы, которые обычно содержат регуляторные последовательности, отвечающие за экспрессию, совместимые с клеткой-хозяином (например, ориджин репликации). Кроме того, может присутствовать некоторое количество различных известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно регулируют экспрессию (осуществляют контроль экспрессии), обычно с использованием последовательности гена-оператора, и содержат последовательности сайта связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

Также применимы для экспрессии другие микроорганизмы, например дрожжи. *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* являются примерами подходящих клеток дрожжей-хозяев, с соответствующими векторами, содержащими последовательности регуляции (контроля) экспрессии (например, промоторы), ориджин репликации, последовательности терминации и т.п., при необходимости. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицерат-киназу и другие гликолитические ферменты. Индуцибельные дрожжевые промоторы включают, наряду с другими, промоторы алкоголь дегидрогеназы, изоцитохром С и ферменты, отвечающие за утилизацию мальтозы и галактозы.

Помимо микроорганизмов для экспрессии и продуцирования антитела против Тау-белка по настоящему изобретению (например, полинуклеотидов, кодирующих антитело к Тау), могут также применяться клетки млекопитающих (например, клетки млекопитающих, выращенные *in vitro* в клеточной культуре). См. Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Подходящие клетки хозяев-млекопитающих включают линии клеток CHO, различные COS клеточные линии, клетки HeLa, клетки миеломных линий и трансформированные В-клетки или гибридомы. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии (регуляторные последовательности), такие как ориджин репликации, промотор и энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) и сайты необходимой информации для процессирования, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты аденилирования и последовательности терминации транскрипции. Примерами соответствующих регуляторных последовательностей являются промоторы генов иммуноглобулинов, SV40, аденовирус, вирус бычьей папилломы, цитомегаловирус и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Будучи синтезированы (либо химическим методом, либо методом рекомбинантной ДНК), целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы антитела по изобретению (например, scFv и т.д.) могут быть очищены стандартными методами, известными из уровня техники, включая преципитацию сульфатом аммония, на колонках для аффинной хроматографии, колоночной хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC, ВЭЖХ), электрофорезом в геле и т.п. (см. в целом Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Антитело по изобретению может быть практически (по существу) чистым, например по меньшей мере чистым на 80-85%, чистым по меньшей мере примерно на 85-90%, чистым по меньшей мере примерно на 90-95% или на 98-99% или выше, например не содержать примесей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы, отличные от антитела по изобретению, и т.д.

Композиции.

В настоящем изобретении предусматривается композиция, содержащая антитело по изобретению. Композиция на основе антитела по изобретению может содержать, помимо антитела по изобретению, одно или более веществ, выбранных из группы, включающей: соль, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.; буферный агент, например Трис(Tris)-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MOPS), N-трис-[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS) и т.д.; солубилизирующий агент; детергент (ПАВ), например неионное ПАВ, такое как Твин-20, и т.д.; ингибитор протеазы; глицерин и т.п.

Нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы и клетки-хозяева

В настоящем изобретении предусматриваются нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело к Тау по изобретению.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Тау по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг. 1В и представленной в SEQ ID NO: 17.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Тау по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг. 1А и представленной в SEQ ID NO: 18.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Тау по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг. 2В и представленной в SEQ ID NO: 19.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к Тау по изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичную нуклеотидной последовательности, изображенной на фиг. 2А и представленной в SEQ ID NO: 20.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело по изобретению, может быть функционально связана с одним или более регуляторных элементов, таких как промотор и энхансер, которые способствуют экспрессии нуклеотидной последовательности в предполагаемых клетках-хозяевах (например, в клетке, которая генетически модифицирована с возможностью синтеза кодированного антитела).

Подходящие промоторные и энхансерные элементы известны в уровне техники. Промоторы, подходящие для экспрессии в бактериальной клетке, включают, но без ограничения, *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *лямбда Р* и *trc*. Промоторы, подходящие для экспрессии в эукариотической клетке, включают, но без ограничения, промоторные и энхансерные элементы генов легкой и/или тяжелой цепей иммуноглобулинов; промотор предранних генов цитомегаловируса; тимидин-киназу вируса простого герпеса; ранний и поздний промоторы вируса SV40; промотор в длинных концевых повторах ретровируса; промотор мышинного гена металлотронеина-I и различные тканеспецифические промоторы, известные в уровне техники.

Согласно некоторым вариантам для экспрессии, например, в клетке дрожжей подходящим промотором является конститутивный промотор, например, такой как ADH1 промотор, PGK1 промотор, ENO промотор, PYK1 промотор и т.п.; или индуцибельные промоторы, например, такие как GAL1 промотор, GAL10 промотор, ADH2 промотор, PHO5 промотор, CUP1 промотор, GAL7 промотор, MET25 промотор, MET3 промотор, CYC1 промотор, HIS3 промотор, ADH1 промотор, PGK промотор, GAPDH промотор, ADC1 промотор, TRP1 промотор, URA3 промотор, LEU2 промотор, ENO промотор, TP1 промотор и AOX1 промотор (например, для применения в *Pichia*). Отбор подходящего вектора и промотора находится в компетенции рядового специалиста в данной области техники.

Промоторы, подходящие для применения в прокариотических клетках-хозяевах, включают, но без ограничения, промотор РНК полимеразы бактериофага T7; *trp* промотор; промотор *lac* оперона; гибридный промотор, например, гибридный промотор *lac/tac*, гибридный промотор *tac/trc*, промотор *trp/lac*, T7/*lac* промотор; *trc* промотор; *tac* промотор и т.п.; *araBAD* промотор; *in vivo* регулируемые промоторы, например, такие как *ssaG* промотор или родственный промотор (см., например, опубликованную заявку на патент США № 20040131637), *pagC* промотор (Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol, 1991, 173(1):86-93; Alpuche-Aranda et al., PNAS, 1992; 89(21):10079-83), *nirB* промотор (Harbome et al. (1992), Mol. Micro. 6:2805-2813) и т.п. (см., например, Dunstan et al. (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004), Vaccine 22:3243-3255; и Chatfield et al. (1992), Biotechnol. 10:888-892); промотор сигма70, например консенсусный промотор сигма70 (см., например, код доступа в GenBank № AX798980, AX798961 и AX798183); промотор стационарной фазы, например, *dps* промотор, *spv* промотор и т.п.; промотор из острова патогенности SPI-2 (см., например, международную заявку WO 96/17951); *actA* промотор (см., например, Shetron-Rama et al. (2002), Infect. Immun. 70:1087-1096); *gpsM* промотор (см., например, Valdivia and Falkow (1996), Mol. Microbiol. 22:367); *tet* промотор (см., например, Hillen, W. and Wissmann, A. (1989), В Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), в издании Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, p. 143-162); SP6 промотор (см., например, Melton et al. (1984), Nucl. Acids Res. 12:7035) и т.п. Подходящие сильные промоторы для применения в клетках прокариот, например, таких как *Escherichia coli*, включают, но без ограничения, T_{7c}, T_{ac}, T5, T7 и P_{Lambda}. Неограничивающие примеры операторов для применения в бактериальных клетках-хозяевах включают оператор и промотор лактозного оперона (репрессорный белок LacI меняет конформацию при контакте с лактозой, тем самым предупреждается связывание репрессорного белка LacI с оператором), промотор и оператор в триптофановом опероне (при образовании комплекса с триптофаном репрессорный белок TrpR находится в конформации, которая связывается с оператором; в отсутствие

триптофана репрессорный белок TrpR находится в конформации, которая не связывается с оператором), и *tac* промотор и оператор (см., например, deBoer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело по изобретению, может входить в состав экспрессионного вектора и/или клонирующего вектора. Если антитело по изобретению содержит два отдельных полипептида, нуклеотидные последовательности, кодирующие эти два полипептида, можно клонировать в одном и том же векторе или в отдельных векторах. Экспрессионный вектор может включать селективный маркер, ориджин репликации и другие компоненты, которые обеспечивают репликацию и/или сохранение вектора.

Специалистам в данной области техники известно множество подходящих векторов; многие из них имеются в продаже и пригодны для создания рекомбинантных конструкций по изобретению. Нижеуказанные векторы приводятся в качестве примера.

Бактериальные: pBs, векторы PhageScript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSV_L (Pharmacia).

Экспрессионные векторы обычно имеют подходящие сайты рестрикции, локализованные близ промоторной последовательности, для того, чтобы обеспечить инсерцию нуклеотидных последовательностей, кодирующих гетерологичные белки. Может присутствовать селективный маркер, работающий (функциональный) в хозяине. Подходящие экспрессионные векторы включают, но без ограничения, вирусные векторы (например, вирусные векторы на основе вируса коровьей оспы (вакцинии); полиовируса; аденовируса (см., например, Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 35:2543-2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther. 6:515-524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700-7704, 1995; Sakamoto et al., Hum Gene Ther. 5:1088-1097, 1999; международные заявки WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655); на основе аденоассоциированного вируса (см., например, Ali et al., Hum Gene Ther. 9:81-86, 1998; Flannery et al., PNAS 94:6916-6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 38:2857-2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther. 4:683-690, 1997; Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641-648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591-594, 1996; Srivastava в международной заявке WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989), 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988), 166:154-165; и Flotte et al., PNAS (1993), 90:10613-10617); SV40; на основе вируса простого герпеса; вируса иммунодефицита человека (см., например, Miyoshi et al., PNAS, 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., J. Virol. 73:7812-7816, 1999); ретровирусный вектор (например, на основе вируса мышинного лейкоза, вируса некроза селезенки и векторы на основе ретровирусов, например, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы мышей Харви, вирус лейкоза птиц, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы) и т.п.

Как отмечалось выше, нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по изобретению. Нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую участки CDR тяжелой и легкой цепей антитела IPN001. Согласно некоторым вариантам нуклеиновая кислота по изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую участки CDR тяжелой и легкой цепей антитела IPN002, причем последовательности, кодирующие CDR, перемежаются с FR-кодирующими нуклеотидными последовательностями. Согласно некоторым вариантам FR-кодирующие нуклеотидные последовательности представляют собой человеческие FR-кодирующие нуклеотидные последовательности.

Клетки-хозяева.

В настоящем изобретении предусматриваются выделенные генетически модифицированные клетки-хозяева (например, *in vitro* клетки), которые были генетически модифицированы с помощью нуклеиновой кислоты по изобретению. Согласно некоторым вариантам выделенная генетически модифицированная клетка-хозяин может продуцировать антитело по изобретению.

Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические клетки-хозяева, такие как клетка млекопитающего, клетка хозяина-насекомого, клетка дрожжей; и прокариотические клетки, например, такие как бактериальные клетки. Введение нуклеиновой кислоты по изобретению в клетку-хозяина можно осуществлять, например, преципитацией фосфатом кальция, трансфекцией, опосредуемой DEAE-декстраном, трансфекцией, опосредуемой липосомами, электропорацией или другим известным методом.

Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и иммортализованные ("бессмертные") клеточные линии. Применимые клеточные линии млекопитающих включают человеческие клеточные линии, клеточные линии нечеловеческих приматов, клеточные линии грызунов (например, мыши, крысы) и т.п. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но без ограничения, клетки HeLa (например, клетки из Американской коллекции типовых культур (ATCC) No. CCL-2), клетки CHO (например, ATCC No. CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, ATCC No. CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC No. CRL-1658), клетки Huh-7, клетки BHK (например, ATCC No. CCL10), клетки PC12 (ATCC No. CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (ATCC No. CRL1651), клетки RAT1, мышинные L клетки (ATCC No. CCL1.3), человеческие эмбриональные клетки почек (HEK)

(ATCC No. CRL1573), клетки HLНepG2 и т.п. В некоторых случаях клетки представляют собой НЕК клетки. В некоторых случаях клетки представляют собой CHO клетки, например, CHO-K1 клетки (ATCC No. CCL-61), CHO-M клетки, CHO-DG44 клетки (ATCC No. PTA-3356) и т.п.

Подходящие клетки дрожжей включают, но без ограничения, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii* и т.п.

Подходящие прокариотические клетки включают, но без ограничения, любые из множества лабораторных штаммов *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.* и т.п. См., например, Carrier et al. (1992), *J. Immunol.* 148:1176-1181; патент США № 6447784; и Sizemore et al. (1995), *Science*, 270:299-302. Как правило, лабораторный штамм не является патогенным. Неограничивающие примеры других применимых бактерий включают, но без ограничения, *Bacillus subtilis* и т.п. Согласно некоторым вариантам клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli*.

Фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении предусматриваются композиции, включающие антитело по изобретению. Обычно композиция содержит эффективное количество антитела. Выражение "эффективное количество" означает дозу, достаточную для достижения нужного результата, например, ослабление неблагоприятного симптома, ассоциированного с таупатией, ослабление симптома таупатии, замедление прогрессирования таупатии и т.д. Как правило, нужный результат представляет собой по меньшей мере ослабление симптома таупатии по сравнению с контролем. Антитело по изобретению можно доставлять таким образом, чтобы обойти гематоэнцефалический барьер, как подробнее описано ниже. Антитело по изобретению можно приготовить и/или модифицировать таким образом, чтобы обеспечить его транспорт через гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая а) антитело, которое специфически связывает эпитоп на N-концевом участке Тау-белка, причем это антитело содержит (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; (iv) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (v) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (vi) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, применимый для введения человеку, при этом композиция не содержит эндотоксинов.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая а) выделенное гуманизированное моноклональное антитело, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент, причем согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая А) выделенное антитело, содержащее гуманизованную каркасную область легкой цепи и гуманизованную каркасную область тяжелой цепи, при этом выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит а) область легкой цепи, включающую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и В) фармацевтически приемлемый эксципиент, причем согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая А) выделенное антитело, которое представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab)₂ или Fab' и которое конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит а) область легкой цепи, включающую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и B) фармацевтически приемлемый эксципиент, причем согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

В настоящем изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая A) выделенное антитело, причем это выделенное антитело содержит константную область человеческой легкой цепи и константную область человеческой тяжелой цепи, и это выделенное антитело конкурирует за связывание с эпитопом на N-концевом участке Тау-полипептида с антителом, которое содержит а) область легкой цепи, включающую (i) участок V_L CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; (ii) участок V_L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; (iii) участок V_L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и б) область тяжелой цепи, включающую (i) участок V_H CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; (ii) участок V_H CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и (iii) участок V_H CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и B) фармацевтически приемлемый эксципиент, причем согласно некоторым вариантам фармацевтически приемлемый эксципиент применим для введения человеку.

Композиции.

В способах по изобретению антитело по изобретению можно вводить хозяину любым обычным методом, который обуславливает нужный терапевтический эффект или диагностический эффект. Таким образом агент можно включать в различные композиции для терапевтического применения. Более конкретно, антитело по изобретению можно приготовить в виде фармацевтической композиции, смешивая с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и можно приготовить в виде препаратов в твердом, полутвердом, жидком или газообразном виде, например, в виде таблеток, капсул, порошков, гранул, мазей, растворов, суппозиториях, препаратов для инъекций, средств, применяемых при ингаляции, и аэрозолей.

В фармацевтических лекарственных формах антитело по изобретению можно вводить в виде его фармацевтически приемлемой соли, или его можно вводить самостоятельно, или его можно вводить в виде ассоциата (конъюгата) или в виде комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Нижеприведенные методы и эксперименты даются лишь в качестве примеров, но ни в коем случае не для ограничения.

Для пероральных препаратов антитело по изобретению можно применять самостоятельно или в комбинации с подходящими добавками для приготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связующими веществами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; с разрыхлителем (веществом, способствующим распаду), таким как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или натрий-карбосиметилцеллюлоза; со смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния; и, при необходимости, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и вкусоароматическими веществами.

Антитело по изобретению можно приготовить в виде препаратов для инъекции путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; при необходимости, с обычными добавками, такими как солюбилизующие вещества, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело по изобретению, готовят, смешивая антитело нужной степени чистоты с необязательными физиологически активными носителями, эксципиентами, стабилизирующими веществами, ПАВ, буферами и/или веществами, регулирующими тоничность. Приемлемые носители, эксципиенты и/или стабилизирующие агенты являются нетоксическими для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин и лимонную кислоту; консерванты (такие как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпарабены, бензалкония хлорид или их комбинации); аминокислоты, такие как аргинин, глицин, орнитин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин, пролин и их комбинации; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как желатин или сывороточный альбумин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, манноза, мальтоза, галактоза, фруктоза, сорбоза, раф(ф)иноза, глюкозамин, N-метилглюкозамин, галактозамин и нейраминановая кислота; и/или неионные ПАВ, такие как Твин, Бридж (Brij), Плуроники, Тритон-X или полиэтиленгликоль (PEG, ПЭГ).

Фармацевтические композиции могут быть в жидкой форме, в лиофилизированной форме или в

жидкой форме, восстановленной из лиофилизированной формы, при этом лиофилизированный препарат следует восстанавливать стерильным раствором перед применением. Стандартная процедура восстановления лиофилизированной композиции состоит в том, чтобы добавить к нему некоторое количество чистой воды (обычно эквивалентное объему, удаленному в процессе лиофилизации); впрочем, растворы, содержащие антибактериальные агенты, можно применять для получения фармацевтических композиций для парентерального введения; см. также Chen (1992), Drug Dev Ind Pharm. 18, 1311-54.

Типичные концентрации антител в фармацевтической композиции по изобретению могут составлять от примерно 1 до примерно 200 мг/мл, или от примерно 50 до примерно 200 мг/мл, или от примерно 150 до примерно 200 мг/мл.

Водную композицию антитела можно приготовить в буферном растворе с определенным pH, например pH в интервале от примерно 4.0 до примерно 7.0, или от примерно 5.0 до примерно 6.0, или же примерно при 5.5. Примеры буферов с pH в этих пределах включают фосфатный, гистидиновый, цитратный, сукцинатный, ацетатный буферы и буферы на основе других органических кислот. Концентрация буфера может составлять от примерно 1 до примерно 100 мМ или от примерно 5 до примерно 50 мМ, в зависимости, например, от буфера и нужной тоничности препарата.

Регулятор тоничности (тонический агент) можно включать в композицию антитела, чтобы модулировать тоничность композиции. Типичные регуляторы тоничности включают хлорид натрия, хлорид калия, глицерин и любой компонент из группы аминокислот, сахара, а также их комбинации. Согласно некоторым вариантам водная композиция является изотонической, хотя могут применяться гипертонические или гипотонические растворы. Термин "изотонический" означает раствор, имеющий ту же тоничность, что и другой раствор, с которым данный раствор сравнивается, такой как физиологический раствор или сыворотка. Регуляторы тоничности могут применяться в количестве от примерно 5 до примерно 350 мМ, например в количестве от 100 мМ до 350 мМ.

ПАВ также можно добавлять в композицию антитела, чтобы уменьшить агрегацию (укрупнение) антитела в составе композиции, и/или минимизировать образование макрочастиц в композиции, и/или уменьшить адсорбцию. Примеры ПАВ включают эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (Tween, твины), полиоксиэтиленалкиловые эфиры (Brij), алкилфенилполиоксиэтиленалкиловые эфиры (Triton-X), сополимер полиоксиэтилена с полиоксипропиленом (Poloxamer, Pluronic, поллоксамер, плуорник) и додецилсульфат натрия (SDS). Примерами подходящих эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот являются Полисорбат 20 (продаваемый под товарным знаком Tween 20™) и полисорбат 80 (продаваемый под товарным знаком Tween 80™). Примерами соответствующих сополимеров полиоксиэтилена с полиоксипропиленом являются сополимеры, продаваемые под названиями Pluronic® F68 или Poloxamer 188™. Примерами подходящих полиоксиэтиленалкиловых эфиров являются соединения, продаваемые под торговым знаком Brij™. Типичные концентрации ПАВ могут быть в интервале от примерно 0.001 до примерно 1% вес./об.

Можно также добавлять лиопротектор, чтобы защитить неустойчивый активный ингредиент (например, белок) в дестабилизирующих условиях в процессе лиофилизации. Известные лиопротекторы включают, например, сахара (включая глюкозу и сахарозу); полиолы (включая маннит, сорбит и глицерин) и аминокислоты (включая аланин, глицин и глутаминовую кислоту). Леопротекторы можно включать в количестве примерно от 10 мМ до 500 мМ.

Согласно некоторым вариантам композиция по изобретению включает антитело по изобретению и один или более вышеуказанных агентов (например, ПАВ, буфер, стабилизирующее вещество, регулятор тоничности) и по существу не содержит один или более консервантов, таких как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпарабены, бензалкония хлорид и их комбинации. Согласно другим вариантам консервант включен в состав композиции, например, в концентрациях в интервале от примерно 0.001 до примерно 2% (вес./об.).

Например, композиция по изобретению может представлять собой жидкую или лиофилизированную композицию, применимую для парентерального введения и может включать от примерно 1 до примерно 200 мг/мл антитела по изобретению; от примерно 0.001 до примерно 1% по меньшей мере одного ПАВ; от примерно 1 до примерно 100 мМ буфера; необязательно, от примерно 10 до примерно 500 мМ стабилизирующего вещества и от примерно 5 до примерно 305 мМ регулятора тоничности; и имеет pH от примерно 4.0 до примерно 7.0.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию, содержащую от примерно 1 до примерно 200 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес./об. Tween 20; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой лиофилизированную композицию, содержащую 1) 15 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес./об. Tween 20; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 2) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес./об. Tween 20; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 3) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 мМ L-гистидина и 250 мМ сахарозы; и имеет pH 5.5; или 4) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.04% вес./об. Tween 20; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ

трегалозы; и имеет pH 5.5; или 6) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 250 mM трегалозы; и имеет pH 5.5.

В другом примере композиция по изобретению для парентерального введения представляет собой жидкую композицию, содержащую 1) 7.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.022% вес./об. Tween 20; 120 mM L-гистидина и 250 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 2) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 10 mM L-гистидина и 125 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 3) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес./об. Tween 20; 10 mM L-гистидина и 125 mM сахарозы; и имеет pH 5.5; или 4) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 10 mM L-гистидина; 125 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 5) 37.5 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес./об. Tween 20; 10 mM L-гистидина и 125 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 6) 5 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 250 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 7) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 250 mM маннита; и имеет pH 5.5; или 8) 75 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 140 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5; или 9) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 250 mM трегалозы; и имеет pH 5.5; или 10) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 250 mM маннита; и имеет pH 5.5; или 11) 150 мг/мл антитела по изобретению; 0.02% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 140 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5; или 12) 10 мг/мл антитела по изобретению; 0.01% вес./об. Tween 20; 20 mM L-гистидина и 40 mM хлорида натрия; и имеет pH 5.5.

Антитело по изобретению можно применять в виде аэрозоля для ингаляции. Антитело по изобретению можно приготовить в виде вытесняемого пропеллента, например, такого как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

Кроме того, антитело по изобретению можно приготовить в виде суппозитория, смешивая их с различными основами, например с эмульгирующими основами или водорастворимыми основами. Антитело по изобретению можно вводить ректально в виде суппозитория. Суппозиторий может включать носители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, но отверждаются при комнатной температуре.

Стандартная лекарственная форма для перорального или ректального введения, например, такая как сиропы, эликсиры и суспензии, может предусматриваться в случае, когда каждая единица дозирования, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит заданное количество композиции, содержащей один или более ингибиторов. Аналогично, стандартные (единичные) лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать заданное количество композиции в виде раствора в стерильной воде, изотоническом растворе хлорида натрия или в другом фармацевтически приемлемом носителе.

Термин "стандартная (единичная) лекарственная форма" в данном контексте относится к физически дискретным единицам (элементам), применимым в качестве однократных доз для человека или животных, при этом каждая единица (элемент) содержит заданное количество антитела к Тау-белку по настоящему изобретению, рассчитанное как количество, достаточное для того, чтобы, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем, вызвать нужный эффект. Индивидуальные характеристики антитела по изобретению могут зависеть от конкретного используемого антитела и от нужного ожидаемого эффекта и от фармакодинамики, обусловленной каждым антителом хозяина.

В способе по настоящему изобретению также находят применение другие методы введения. Например, антитело по изобретению можно приготовить в виде суппозитория и в некоторых случаях в виде аэрозоля и интраназальной композиции. Для суппозитория в состав наполнителя включает обычные связующие и носители, например, такие как полиалкиленгликоли и триглицериды. Такие суппозитории можно приготовить из смесей, содержащих активный ингредиент в концентрации от примерно 0.5 до примерно 10% (вес.), например, от примерно 1 до примерно 2%.

Интраназальные композиции обычно включают наполнители, которые не вызывают раздражения в слизистой носа и не нарушают цилиарной функции. Можно применять разбавители, например, такие как вода, водный раствор хлорида натрия или другие известные вещества. Композиции для назального применения могут содержать также консерванты, например, но без ограничения, такие как хлорбутанол и бензалкония хлорид. Может также присутствовать поверхностно-активное вещество (ПАВ) для повышения всасывания антитела по изобретению в слизистую оболочку носа.

Антитело по изобретению можно вводить в виде инъекций. Обычно композиции для инъекций готовят в виде жидких растворов или суспензий; также можно готовить твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Препарат может также быть в виде эмульсии или антитело может быть инкапсулировано в липосомы в качестве носителей.

Подходящими эксципиентами-наполнителями (носителями) являются, например, вода, раствор хлорида натрия, декстроза, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации. Кроме того, при необходимости носитель (наполнитель) может содержать минорные количества вспомогательных веществ, например, таких как увлажняющие агенты или эмульгаторы или буферные агенты. Современные методы приготовления таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники.

См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985. Композиция или состав для введения в любом случае должны содержать некоторое количество антитела по изобретению, адекватное для достижения заданного состояния у пациента, проходящего лечение.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители, являются легкодоступными. Кроме того, общедоступными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, такие как вещества, корректирующие pH, и буферизирующие агенты, вещества, корректирующие тоничность, стабилизирующие вещества, увлажняющие вещества.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению готовят в виде препарата с контролируемым высвобождением. Препараты с контролируемым высвобождением можно приготовить методами, хорошо известными в уровне техники. Подходящие примеры препаратов с пролонгированным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, в котором матрицы находятся в виде изделий определенной формы, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с пролонгированным высвобождением включают сложные полиэфиры, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамат, нерасщепляемый сополимер этилена с винилацетатом, гидрогели, полилактоиды, расщепляемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Возможную потерю биологической активности и возможные изменения иммуногенности антител, содержащихся в препаратах с пролонгированным высвобождением, можно предупредить, используя соответствующие добавки, регулируя содержание влаги и разрабатывая специфические композиции полимерной матрицы.

Лекарственная форма с контролируемым высвобождением в объеме настоящего изобретения означает любую из лекарственных форм с замедленным высвобождением. Для целей настоящего описания нижеприведенные термины по существу эквивалентны контролируемому высвобождению: непрерывное высвобождение, контролируемое (регулируемое) непрерывное высвобождение, задержанное высвобождение, депо, постепенное высвобождение, долговременное высвобождение, запрограммированное высвобождение, пролонгированное высвобождение, пропорциональное высвобождение, отсроченное высвобождение, продленного действия, высвобождение с задержкой, медленное высвобождение, высвобождение с интервалами, замедленное высвобождение, оболочка для высвобождения во времени, рассчитанное по времени высвобождение, замедленное действие, пролонгированное действие, многоуровневое (многослойное) действие, продолжительное действие, повторное действие, медленное действие, замедленное действие, препараты с замедленным действием и с продленным высвобождением. Более подробное обсуждение этих терминов можно найти в монографии Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.).

Различные методы (технологии) контролированного высвобождения охватывают широкий спектр лекарственных форм. Технологии контролированного высвобождения включают, но без ограничения, физические и химические системы.

Физические системы включают, но без ограничения, резервуарные системы с мембранами, контролирующими скорость, такие как системы микроинкапсуляции, и мембранные системы; резервуарные системы без мембран, контролирующими скорость, такие как пористое волокно, ультрамикропористый триацетат целлюлозы и пористые полимерные субстраты и пены; монолитные системы, включая "физические растворы" таких систем в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, неэродируемых, эродируемых, под действием факторов окружающей среды, и деструктурируемых), и материалы, физически диспергированные в непористых, полимерных или эластомерных матрицах (например, неэродируемых, эродируемых, под действием факторов окружающей среды, и деструктурируемых); многослойные структуры, включая резервуарные слои, химически сходные или несходные с внешними контрольными слоями; и другие физические методы, такие как осмотические насосы или адсорбция на ионообменных смолах.

Химические системы включают, но без ограничения, химическую эрозию полимерных матриц (например, гетерогенную или гомогенную эрозию) или биологическую эрозию полимерных матриц (например, гетерогенную или гомогенную). Более подробное обсуждение классификации систем для контролированного высвобождения можно найти в монографии Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.).

Существует ряд систем доставки лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением, которые разработаны для перорального введения. Эти системы включают, но без ограничения, осмотические желудочно-кишечные системы доставки с контролируемым осмотическим давлением; гидродинамические с контролируемым давлением желудочно-кишечные системы доставки; мембранные желудочно-кишечные системы доставки, которые включают устройства для желудочно-кишечной доставки с контролируемым проникновением через микропористую мембрану; устойчивые к желудочному соку нацеленные на кишечник желудочно-кишечные системы доставки с контролируемым высвобождением; гель-диффузионные желудочно-кишечные системы доставки и ионообменные желудочно-кишечные системы доставки, которые включают катионные и анионные лекарства. Дополнительную информацию относительно систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением можно найти в монографии

Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.).

Установление доз.

Подходящие дозы может определить лечащий врач или другой квалифицированный медицинский персонал на основании различных клинических показателей. Как хорошо известно в медицине, дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая габариты пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение для введения, пол пациента, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, вводимые одновременно. Антитело по изобретению можно вводить в количествах от 1 нг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела, например, от 0.1 до 10 мг/кг массы тела, например, от 0.5 до 5 мг/кг массы тела; однако предусматриваются дозы ниже и выше этих приведенных в качестве примера доз, в особенности учитывая вышеприведенные факторы. Если схема представляет собой непрерывную инфузию, дозы также могут быть в интервале от 1 мкг до 10 мг на 1 кг массы тела в минуту.

Специалисты в данной области легко поймут, что уровни доз могут меняться в зависимости от конкретного антитела, тяжести симптомов и чувствительности субъекта к побочным эффектам. Предпочтительные дозы для данного соединения может легко определить специалист в данной области различными методами.

Способы введения.

Антитело по изобретению вводят субъекту любым подходящим методом и путем, применимым для доставки лекарства, включая методы *in vivo* и *ex vivo*, а также системные и локальные пути введения.

Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают интраназальный, внутримышечный, интратрахеальный, интратекальный (подоболочечный), подкожный, интрадермальный, топический, внутривенный, внутриартериальный, ректальный, назальный, пероральный и другие энтеральные и парентеральные пути введения. Пути введения можно, при необходимости, комбинировать или корректировать в зависимости от антитела и/или нужного эффекта. Антитело по изобретению можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят перорально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят в виде ингаляции. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят интраназально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят местно (локально). Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят интракраниально. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам композицию антитела по изобретению вводят интратекально.

Антитело по настоящему изобретению можно вводить хозяину любыми доступными обычными методами и путями, пригодными для доставки обычных лекарств, включая системные или локальные пути. В целом пути введения, рассматриваемые в изобретении, включают, но без ограничения, энтеральный и парентеральный пути или ингаляцию.

Парентеральные пути введения, отличные от ингаляции, включают, но без ограничения, топический, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, внутриглазничный, интракапсулярный, внутрипозвоночный (интраспинальный), внутригрудный, интратекальный и внутривенный пути, т.е. любой путь введения, отличный от введения через пищевод. Парентеральное введение можно осуществлять для системной или локальной доставки антитела по изобретению. Если нужна системная доставка, введение обычно включает инвазивное введение или системное всасывание при топическом введении или введении фармацевтических препаратов через слизистую оболочку.

Антитело по изобретению можно также доставлять субъекту с помощью энтерального введения. Энтеральные пути введения включают, но без ограничения, пероральную и ректальную (например, с использованием суппозитория) доставку.

Под лечением (терапией) понимают по меньшей мере уменьшение интенсивности симптомов, обусловленных патологическим состоянием, причиняющим боль хозяину, причем уменьшение интенсивности понимают в широком смысле по отношению по меньшей мере к уменьшению величины показателя, например симптома, обусловленного патологическим состоянием, лечение которого проводится, например, таупатией. Фактически, лечение также включает ситуации, когда патологическое состояние или по меньшей мере связанный с ним симптом полностью ингибируются, например предупреждается их наступление, или останавливаются, например завершаются, так что хозяин больше не страдает от патологического состояния или по меньшей мере от симптомов, которые характеризуют патологическое состояние.

Согласно некоторым вариантам антитело по изобретению вводят с помощью инъекции и/или доставки, например, в область артерии мозга или непосредственно в ткань мозга. Антитело по изобретению можно также вводить непосредственно в целевую область, например, доставкой с помощью библистики (биологической баллистики) в целевую область.

Различных хозяев (где термин "хозяин" употребляется взаимозаменяемо с терминами "субъект", "индивидуум" и "пациент") лечат согласно способам по изобретению. Обычно такие хозяева являются "млекопитающими", причем этот термин применяется в широком смысле для описания организмов, которые относятся к классу млекопитающих, включая отряд хищных (например, собак и кошек), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс) и приматов (например, людей, шимпанзе и низших обезьян).

Согласно некоторым вариантам хозяева являются людьми.

Предусматриваются наборы с разовыми дозами антитела по изобретению, например в виде пероральных или инъектируемых доз. В таких наборах, помимо контейнеров, содержащих разовые дозы, находится информационный вкладыш в упаковку, в котором описывается применение и соответствующие преимущества антитела при лечении целевого патологического состояния. Предпочтительные соединения и разовые дозы описаны выше.

Способы обнаружения.

В настоящем изобретении предусматриваются *in vitro* способы обнаружения Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и способы обнаружения Тау-полипептида у живого субъекта *in vivo*. Способ по изобретению обнаружения *in vitro* может быть количественным. Следовательно, Тау-полипептид может служить в качестве биомаркера прогрессирования таупатии или отклика на лечение таупатии.

Детектируемый/количественно определяемый Тау-полипептид может представлять собой а) полноразмерный Тау-полипептид; б) N-концевой фрагмент полноразмерного Тау-полипептида; в) тотальный Тау-полипептид, где "тотальный Тау-полипептид" может включать полноразмерный Тау-полипептид любой изоформы; д) свободный Тау-полипептид ("Тау"), например, Тау-полипептид ("Тау"), который не связан с антителом к "Тау"; и е) любые N-концевые фрагменты "Тау", которые присутствуют в биологическом образце и которые выявляют эпитоп, узнаваемый антителом к "Тау" по изобретению. Аминокислотные последовательности человеческого полноразмерного "Тау" представлены на фиг. 6A-D.

В ряде случаев метод обнаружения по изобретению может также включать определение уровня $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в биологическом образце. Определение уровня $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в биологическом образце можно осуществлять с помощью иммунологического анализа (например, ELISA), например, с применением антитела, которое связывает $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$.

Подходящие биологические образцы включают, например, спинномозговую жидкость (ликвор), кровь, плазму крови, сыворотку крови, мочу и слюну.

In vitro метод обнаружения Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта, по настоящему изобретению обычно включает а) осуществление контакта биологического образца с антителом к "Тау" по настоящему описанию и б) обнаружение связывания антитела к Тау-полипептиду, присутствующему в образце. В ряде случаев антитело к Тау содержит V_H и/или V_L CDR, изображенные на фиг. 1A и 1B. В некоторых случаях антитело к Тау содержит V_H и/или V_L CDR, изображенные на фиг. 2A и 2B.

Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для того, чтобы определить, действительно ли у субъекта имеется таупатия или риск развития таупатии. Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для определения стадии (тяжести) таупатии. Метод обнаружения по настоящему изобретению можно применять для определения отклика пациента на схему лечения таупатии. Биологический образец можно тестировать, применяя метод обнаружения по изобретению, причем биологический образец получают от субъекта с подозрением на таупатию, от субъекта, у которого была диагностирована таупатия, у субъекта с генетической предрасположенностью к развитию таупатии, и т.д.

В настоящем изобретении предусматривается способ диагностики нейродегенеративной таупатии у субъекта. Этот способ обычно включает (а) определение уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и (б) сравнение уровня Тау-полипептида с эталоном, стандартом или нормальным контрольным значением, которое показывает уровень Тау-полипептида у здоровых контрольных субъектов. Заметная разница между уровнем Тау-полипептида в биологическом образце и нормальным контрольным значением указывает на наличие нейродегенеративной таупатии у субъекта.

В настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга прогрессирования или мониторинга реакции на лечение нейродегенеративной таупатии у субъекта. Способ обычно включает сравнение уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временной точке, с уровнем Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке. Разница между уровнем Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке, и уровнем Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временной точке, может отвечать на вопрос i) прогрессирует ли таупатия или прогрессирование заболевания остановлено; и/или ii) с какой скоростью прогрессирует таупатия; и/или iii) наблюдается ли у пациента положительный клинический ответ на терапию с помощью лекарственного средства или с помощью другой схемы лечения таупатии.

В настоящем изобретении предусматривается способ определения стадии таупатии. Например, способ по изобретению может предусматривать определение стадии болезни Альцгеймера. Например, уровень Тау-полипептида в биологическом образце (например, в CSF (ликворе) или другом биологическом образце) от живого субъекта может служить указанием на стадию AD по Брааку (Braak). Braak and Braak (1995), *Neurobiol. Aging* 16:271. Например, уровень Тау-полипептида в биологическом образце от живого субъекта может указывать на стадию AD у субъекта: трансэнториальные стадии I-II AD; лимбические

стадии III-IV AD или неокортикальные стадии V-VI AD.

Уровень Тау-полипептида в биологическом образце можно определять любым подходящим способом, известным в уровне техники. Подходящие способы включают, но без ограничения, белковый ("Вестерн") блоттинг, иммунопреципитацию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA, РИА), сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), двумерный гель-электрофорез, масс-спектроскопию (MS), времяпролетную MS с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), времяпролетную усиленную поверхность лазерную десорбцию/ионизацию (SELDI-TOF), высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC, ВЭЖХ), жидкостную экспресс-хроматографию белков (FPLC), многомерную жидкостную хроматографию (LC) с последующей тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) и лазерную денситометрию.

В настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга прогрессирования таупатии у субъекта, который обычно включает а) определение первого уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временной точке; б) определение второго уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке; и с) сравнение второго уровня "Тау" с первым уровнем "Тау". Стадии определения могут включать i) осуществление контакта биологического образца с антителом к "Тау" по изобретению и ii) количественное определение связывания антитела с Тау-полипептидом, присутствующим в образце.

В некоторых случаях первая временная точка представляет собой временную точку перед началом применения схемы лечения, а вторая временная точка представляет собой временную точку после начала применения схемы лечения. Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается способ мониторинга отклика на терапию с помощью агента, который лечит таупатию, причем этот способ включает а) определение первого уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта в первой временной точке, т.е. перед началом терапии с помощью агента для лечения таупатии; б) определение второго уровня Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта во второй временной точке, т.е. после начала терапии с помощью агента для лечения таупатии; и с) сравнение второго уровня "Тау" с первым уровнем "Тау".

Способ мониторинга прогрессирования таупатии по изобретению можно применять для мониторинга прогрессирования синуклеинопатии, например болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т.д. Например, мониторинг (контроль) прогрессирования PD с деменцией (PDD) можно осуществлять способом по изобретению.

При некоторых таупатиях уровень "Тау" повышается по мере прогрессирования заболевания. При других таупатиях уровень "Тау" понижается по мере прогрессирования заболевания. Так, например, уровень "Тау" повышается по мере прогрессирования AD и понижается по мере прогрессирования FTD.

Способ по изобретению может включать применение набора или устройства для анализа, содержащего антитело к Тау по изобретению. В настоящем изобретении предусматривается набор и устройства для анализа для осуществления способа, описанного в настоящем документе. Набор по изобретению включает антитело к Тау по настоящему описанию.

Антитело к Тау может быть иммобилизовано на нерастворимом носителе (например, на тест-полоске, лунке многолуночного планшета, грануле (например, магнитной грануле, шарике) и т.д.). Подходящие носители хорошо известны и включают, наряду с прочими, коммерчески доступные материалы для колонок (насадки), полистирольные гранулы (шарики), латексные гранулы, магнитные гранулы, коллоидные частицы металлов, стеклянные и/или силиконовые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембраны, листы, лунки реакционных планшетов (например, многолуночных планшетов), пластиковые трубки и т.д. Твердый носитель может содержать любое из множества веществ, включая, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, натуральную и модифицированную целлюлозу, полиакриламиды, агарозу и магнетит. Соответствующие методы иммобилизации антитела по изобретению на твердом носителе хорошо известны и включают, но без ограничения, ионное, гидрофобное, ковалентное взаимодействие и т.п. Твердые носители могут быть растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам соответствующий твердый носитель обычно нерастворим в водном растворе.

Антитело к Тау по настоящему изобретению может содержать детектируемую метку. Если антитело содержит детектируемую метку, набор по изобретению может включать один или более реагентов для обнаружения (проявления) детектируемой метки. Меченое антитело может включать метку, например хемилюминесцентный агент, частицу, колориметрический агент, агент для переноса энергии, фермент, флуоресцентный агент или радиоизотоп. Подходящие детектируемые метки включают любую композицию, детектируемую (обнаруживаемую) спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими методами. Подходящие детектируемые метки включают, но без ограничения, флуоресцентные метки (например, флуоресцеин изотиоцианат, техасский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и т.п.); радиоизотопные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P); ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие ферменты, которые

действуют на субстрат, давая продукт, который можно обнаружить флуорометрическим, колориметрическим или спектрофотометрическим методом).

Набор по изобретению может также включать один или более других, дополнительных компонентов, где дополнительные компоненты включают 1) положительный контроль; 2) буфер (например, буфер для связывания; буфер для отмывки; и т.д.); 3) реагенты для генерирования детектируемого сигнала и т.п. Другие необязательные компоненты набора включают ингибитор протеазы; детектируемую метку и т.д. Различные компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах или, при необходимости, некоторые совместимые компоненты могут быть предварительно объединены в одном контейнере.

Помимо вышеуказанных компонентов набор по изобретению может включать инструкции по применению компонентов набора для осуществления способа изобретения на практике. Инструкции для практического осуществления способа по изобретению обычно записаны на подходящем носителе информации. Например, инструкции могут быть напечатаны на носителе, таком как бумага или пластик и т.д. В этом случае инструкции могут находиться в наборе в виде вкладыша в упаковку, этикетки на контейнере, входящем в набор или его компоненты (т.е. связанные с упаковкой или субупаковкой (внутренней упаковкой)) и т.д. Согласно другим вариантам инструкции находятся в виде файла электронных документов в базе данных на соответствующем машиночитаемом носителе информации, например, в виде постоянной памяти на компакт-диске (CD-ROM), на цифровом универсальном диске (DVD), на дискете и т.д. Согласно другим вариантам действительные инструкции отсутствуют в наборе, но предусматривается способ получения инструкций из удаленного источника, например, по Интернету. Примером такого варианта является набор, который включает web-адрес, где можно изучить инструкции и/или где можно скачать (загрузить) эти инструкции. Как и в случае инструкций, этот способ получения инструкций доступен на соответствующем носителе.

Устройство для анализа может включать антитело к Тау, иммобилизованное на твердом субстрате. Устройство для анализа может быть в любом из множества форматов, например, в виде тест-полоски, индикаторной полоски; и т.д.

In vivo визуализация.

Как обсуждается выше, в настоящем изобретении предусматриваются способы обнаружения Тау-полипептида в организме живого субъекта, например методом *in vivo* визуализации. Например, согласно одному варианту *in vivo* визуализацию Тау-полипептида можно осуществлять методами позитронно-эмиссионной томографии (PET, ПЭТ), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT), оптической визуализации в ближней инфракрасной области спектра (NIR, НИР) или магнитно-резонансной томографии (MRI). Антитело к Тау по изобретению вводят субъекту и детектируют присутствие и/или уровень Тау-полипептида. Антитело к Тау может включать метку, пригодную для применения в PET, SPECT, NIR или MRI. Такие метки включают контрастный агент или радиоизотоп, причем контрастный агент или радиоизотоп представляет собой такой контрастный агент или радиоизотоп, который пригоден для применения при визуализации, например, в способах визуализации на людях, описанных выше. В некоторых случаях антитело к Тау содержит V_H и/или V_L CDR участки антитела IPN001. В некоторых случаях антитело к Тау содержит V_H и/или V_L CDR участки антитела IPN002. Антитело к Тау может содержать одну или более гуманизированных каркасных областей, описанных выше.

Подготовка отчета.

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает обнаружение Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта и с учетом уровня детектированного Тау-полипептида создание отчета и/или руководства по терапии или тактике ведения субъекта, от которого был получен биологический образец.

Отчет может включать показание касательно вероятности таупатии у субъекта; показание касательно тяжести таупатии; показание касательно того, наблюдается ли у субъекта положительный клинический отклик на лечение таупатии; и т.п.

Так, отчет может включать информацию, например, такую как прогнозируемая вероятность того, что у субъекта наблюдается или обнаружится таупатия; рекомендации, относящиеся к последующему обследованию; рекомендация, касающаяся воздействия терапевтического лекарственного средства и/или других способов поддержания здоровья.

Например, способы по настоящему изобретению могут также включать стадию подготовки или выдачи отчета, в котором представлены результаты обследования субъекта, причем этот отчет может быть представлен в виде информации на электронных носителях (например, в виде информации на мониторе компьютера) или на материальных носителях (например, отчет, напечатанный на бумаге или на другом материальном носителе). Оценка вероятности того, что у человека наблюдается таупатия или риск развития таупатии, может именоваться "отчет о риске", "степень риска" или "оценка (степень) правдоподобия (вероятности)". Человек или организация, которые готовят отчет ("генератор отчета"), могут также осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработка образцов и т.п., или же другая организация, а не генератор отчета может осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработка образцов и т.п. Отчет об оценке степени риска может быть предоставлен пользователю. "Пользователь" может быть медицинским работником (например, клиницистом, врачом-лаборантом или терапевтом).

Меры по поддержанию здоровья.

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает детектирование Тау-полипептида в биологическом образце, полученном от субъекта; и на основании полученного уровня Тау-полипептида составление отчета и/или руководства по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

Так, например, в зависимости от результатов, полученных при осуществлении способа по изобретению, может быть указано, что субъекту рекомендуется терапевтическое вмешательство (лечение) по поводу таупатии и/или что следует рассмотреть специальные меры по поддержанию здоровья субъекта.

Терапевтическое вмешательство (воздействие) может включать, например, лекарственную терапию для лечения болезни Альцгеймера. Примеры лекарственной терапии для лечения болезни Альцгеймера включают, но без ограничения, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, включая, но без ограничения, арисепт (донепезил), экселон (ривастигмин), метрифонат и такрин (когнекс); антитело к Аβ (например, соланезумаб); антитело к Тау; нестероидные противовоспалительные агенты, включая, но без ограничения, ибупрофен и индометацин; ингибиторы циклооксигеназы-2 (Cox2), такие как Целебрекс; и ингибиторы моноамин оксидазы, например, такие как селегилен (элдеприл или депренил). Дозировки каждого из вышеуказанных агентов известны в уровне техники. Например, арисепт можно вводить в дозировке 50 мг в день перорально в течение 6 недель, затем в случае хорошей переносимости субъектом по 10 мг в день.

Определение количества свободного и связанного внеклеточного Тау.

После введения субъекту антитела к еТау (внеклеточного "Тау") может показаться интересным определить количество еТау, оставшегося в CSF или ISF, которое не связано с антителом к еТау. В настоящем изобретении предусматриваются способы определения количества такого свободного еТау. Схематическое изображение способа определения количества еТау, остающегося в CSF или ISF, не связанного с антителом к еТау, дано на фиг. 54A. После введения субъекту антитела к еТау может представить интерес определение количества еТау в CSF или ISF, которое связано с антителом к еТау. Схематическое изображение способа определения количества еТау в CSF или ISF, связанного с антителом к еТау, дано на фиг. 54B.

Определение количества свободного внеклеточного Тау.

В настоящем изобретении предусматривается способ определения количества внеклеточного Тау (еТау), не связанного с антителом к еТау, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к еТау. Способ, как правило, включает а) осуществление контакта иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, при этом иммобилизованное антитело конкурирует за связывание с еТау с антителом к еТау, введенным субъекту, и при этом контакт осуществляется в условиях, пригодных для связывания несвязанного еТау с иммобилизованным антителом; и б) определение количества еТау, связанного с иммобилизованным антителом. Количество еТау, связанного с иммобилизованным антителом, указывает на количество еТау, не связанного с антителом к Тау, в образце. В некоторых случаях количество еТау, связанного с иммобилизованным антителом, определяют меченным детектируемой меткой третьим антителом, которое не конкурирует с иммобилизованным антителом за связывание с еТау.

Как отмечается выше, в анализе определяют количество еТау в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к еТау. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой терапевтическое гуманизованное антитело к еТау. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой гуманизованное антитело к еТау по настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к еТау представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества еТау, не связанного с антителом к еТау, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к еТау, описанным выше; и б) определение уровня тотального Тау в образце.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества еТау, не связанного с антителом к еТау, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к еТау, описанным выше; и б) сравнение уровня несвязанного Тау в образце с уровнем тотального Тау в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к еТау.

Способ обнаружения по изобретению применим для определения уровня внеклеточного Тау. "Внеклеточный Тау" ("еТау") в данном контексте охватывает любой Тау-полипептид, который можно обнаружить в спинномозговой (цереброспинальной) жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам еТау представляет собой полипептид длиной 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Тау; например, согласно некоторым вариантам еТау представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам еТау представляет собой полипептид протяженностью в 171 аминокислоту и содержит аминокислоты 2-172 полноразмерного Тау; например, согласно некоторым вариантам еТау представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам еТау представляет собой еТау-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Соглас-

но некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Согласно некоторым вариантам eTau-полипептид имеет длину от примерно 50 до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 до примерно 75 aa, от примерно 75 до примерно 100 aa, от примерно 100 до примерно 125 aa, от примерно 125 до примерно 150 aa или от примерно 150 до примерно 175 aa и может содержать от 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от примерно 150 до примерно 175 последовательных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Tau. Примеры eTau-полипептидов изображены на фиг. 20.

Определение количества внеклеточного Tau, связанного с антителом к eTau.

В настоящем изобретении предусматривается способ определения количества eTau, связанного с терапевтическим антителом к eTau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение терапевтическим антителом к eTau. Способ обычно включает а) осуществление контакта иммобилизованного антитела с образцом CSF или ISF, полученным от субъекта, где иммобилизованное антитело не конкурирует за связывание с eTau с антителом к eTau, введенным субъекту, причем указанное осуществление контакта проводят в условиях, пригодных для связывания eTau, связанного с терапевтическим антителом, с иммобилизованным антителом; и б) определение количества комплекса: терапевтическое антитело к eTau/eTau, связанное с иммобилизованным антителом, где количество комплекса терапевтического антитела к eTau/eTau, связанное с иммобилизованным антителом, является показателем количества eTau, связанного с терапевтическим антителом, присутствующим в образце. Количество комплекса терапевтического антитела к eTau/eTau, связанное с иммобилизованным антителом, определяют, детектируя антитело к eTau, присутствующее в комплексе антитела к eTau/eTau. Количество комплекса терапевтического антитела к eTau и eTau, связанного с иммобилизованным антителом, определенное детекцией антитела к eTau в комплексе антитела к eTau/eTau, является показателем количества Tau, связанного с терапевтическим антителом в образце CSF или ISF.

Как отмечалось выше, в анализе измеряют количество eTau, связанного с терапевтическим антителом, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau. В некоторых случаях антитело к eTau представляет собой терапевтическое гуманизованное антитело к eTau. В некоторых случаях антитело к eTau представляет собой гуманизованное антитело к eTau по настоящему изобретению. В некоторых случаях антитело к eTau представляет собой hu-IPN002.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) определение уровня тотального Tau в образце. В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) определение количества eTau, который не связан с терапевтическим антителом к eTau, в образце CSF или ISF.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) определение уровня тотального Tau в образце и с) определение количества eTau, который не связан с терапевтическим антителом к eTau, в образце CSF или ISF.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) сравнение уровня Tau, связанного с антителом к eTau в образце с уровнем тотального Tau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, перед лечением антителом к eTau.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и с) сравнение уровня несвязанного Tau и уровня Tau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, перед лечением антителом к eTau.

Способ обнаружения по изобретению применим для определения уровня внеклеточного Tau, связанного с терапевтическим антителом. "Внеклеточный Tau" ("eTau") в данном контексте охватывает любой Tau-полипептид, который можно обнаружить в спинномозговой (цереброспинальной) жидкости (CSF) или интерстициальной жидкости (ISF). Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид длиной 175 аминокислот и содержит аминокислоты 2-176 полноразмерного Tau; например, согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид протяженностью в 171 аминокислоту и содержит аминокислоты 2-172 полноразмерного Tau; например, согласно некоторым вариантам eTau представляет собой полипептид, содержащий

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-2 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-3 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам eTau представляет собой eTau-4 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Согласно некоторым вариантам eTau-полипептид имеет длину от примерно 50 до примерно 175 аминокислот, например, от примерно 50 до примерно 75 aa, от примерно 75 до примерно 100 aa, от примерно 100 до примерно 125 aa, от примерно 125 до примерно 150 aa или от примерно 150 до примерно 175 aa и может содержать от 50 до примерно 75, от примерно 75 до примерно 100, от примерно 100 до примерно 125, от примерно 125 до примерно 150 или от примерно 150 до примерно 175 последовательных аминокислот из аминокислот 2-176 полноразмерного Tau. Примеры eTau-полипептидов изображены на фиг. 20.

Написание (составление) отчета.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) написание отчета и/или рекомендаций по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; б) сравнение уровня несвязанного Tau в образце с уровнем тотального Tau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к eTau; и с) составление отчета и/или рекомендаций по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

В некоторых случаях способ по изобретению включает а) определение количества eTau, связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и б) составление (написание) отчета с результатами определения. Отчет может также включать как количество несвязанного, так и связанного Tau в образце с уровнем тотального Tau в образце CSF или ISF после лечения антителом к Tau и количество тотального Tau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта перед лечением антителом к eTau.

Например, отчет может включать показание касательно того, наблюдается ли у субъекта положительный клинический отклик на лечение таупатии; показание касательно того, следует ли поддерживать, повышать или снижать дозу антитела к eTau; и т.п.

Так, отчет может включать информацию, например, такую как рекомендации, относящиеся к последующему обследованию; рекомендация, касающаяся воздействия терапевтического лекарственного средства и/или других способов поддержания здоровья; рекомендация повысить дозу антитела к eTau; рекомендация сохранить дозу антитела к eTau; рекомендация понизить дозу антитела к eTau; и т.п.

Например, способы по настоящему изобретению могут также включать стадию составления (написания) или выдачи отчета, в котором представлены результаты обследования субъекта, причем этот отчет может быть представлен в виде информации на электронных носителях (например, в виде информации на мониторе компьютера) или на материальных носителях (например, отчет, напечатанный на бумаге или на другом материальном носителе). Человек или организация, которые готовят отчет ("генератор отчета"), может также осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработка образцов и т.п., или же другая организация, а не генератор отчета может осуществлять такие меры, как сбор образцов, обработка образцов и т.п. Отчет об оценке степени риска может быть предоставлен пользователю. "Пользователь" может быть медицинским работником (например, клиницистом, врачом-лаборантом или терапевтом).

Меры по поддержанию здоровья.

В некоторых примерах способ обнаружения по изобретению включает а) определение количества антитела к eTau в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и на основании определенного количества eTau составление отчета и/или руководства по терапии или мерам для поддержания здоровья субъекта, от которого получен биологический образец.

В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и на основании определенного количества eTau, не связанного с антителом к eTau, сохранение дозы антитела к eTau, которое вводят субъекту.

В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определение количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и на основании определенного количества eTau, не связанного с антителом к eTau, повышение дозы антитела к eTau, которое вводят субъекту.

В некоторых примерах способ по изобретению включает а) определению количества eTau, не связанного с антителом к eTau, в образце CSF или ISF, полученном от субъекта, проходящего лечение антителом к eTau, описанным выше; и на основании определенного количества eTau, не связанного с антите-

лом к τ ау, уменьшение дозы антитела к τ ау, которое вводят субъекту.

Примеры

Нижеприведенные примеры даются с тем, чтобы предоставить рядовому специалисту в данной области техники полное описание того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, но не претендуют ни на ограничение объема того, что заявители рассматривают как свое изобретение, ни на то, что нижеприведенные эксперименты представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были предприняты меры для того, чтобы гарантировать точность в том, что касается числовых показателей (например, количеств, температур и т.д.), но возможны некоторые экспериментальные ошибки и отклонения (девиации). Если не указано иное, части означают весовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление представляет собой атмосферное давление или давление, близкое к атмосферному. Могут употребляться стандартные сокращения, например п.о. (bp), пара(ы) оснований; kb, т.п.н., тысяча(и) пар нуклеотидов; пкл, пиколитр(ы); с, секунда(ы); мин, минута(ы); ч, час(ы); aa, аминокислота(ы); nt, нт, нуклеотид(ы); в/м, внутримышечный(о); i.p., и/п, интраперитонеальный(о); s.c, п/к, подкожный(о); и т.п.

Пример 1. Клонирование и сквенирование V_H и V_L областей антител IPN001 и IPN002.

Определяли аминокислотные последовательности областей V_H и V_L антител IPN001 (также называемого в данном контексте "IPN1" или "IPN-1") и IPN002 (также называемого в данном контексте "IPN2" или "IPN-2"). Аминокислотные последовательности V_H и V_L областей антитела IPN001 показаны на

фиг. 1A и 1B соответственно. Аминокислотные последовательности областей V_H и V_L антитела IPN002 показаны на фиг. 2A и 2B соответственно. Домены (участки) CDR показаны жирным шрифтом и подчеркнуты. CDR определяли по номенклатуре Kabat et al. (см. табл. 1; и J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); и Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)).

Пример 2. Электрофизиологический анализ действия антител к τ ау.

Материалы и методы.

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч-кламп) на целых клетках кортикальных нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), культивированных на монослое нормальных человеческих астроцитов, проводили с использованием пэтч-пипетки (2-5 мОм, m Ω), заполненной раствором, содержащим (мМ): К-метилсульфат - 140, NaCl - 10, CaCl₂ - 1, Mg-АТФ - 3; Na-GTP - 0.4, EGTA - 0.2, HEPES - 10, фосфокреатин с корректированным рН 7.3 и мОсм (миллиосмоли) = 300. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl - 140, KCl - 2.5, MgCl₂ - 2, CaCl₂ - 2, Hepes - 10, D-глюкоза - 10, сахароза - 20. Корректировали рН 7.4, мОсм = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). AD- τ ау и AD- τ ау, предварительно инкубированный с IPN001 или IPN002 (2 ч при комнатной температуре или 24 ч при 4°C в весовом соотношении 10:1), наносили с помощью микроперфузионной системы MinisQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме офлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при комнатной температуре.

Результаты.

Данные показаны на фиг. 3A-D.

Нанесение (раствора) AD- τ ау (6 мк/мл) вызывала деполяризацию мембраны кортикальных нейронов (A, B и C). Преинкубация AD- τ ау (6 мк/мл) с IPN001 (60 мк/мл) (A) или IPN002 (60 мк/мл) (B) в течение >2 ч снижала деполяризацию мембраны, опосредуемую AD- τ ау. C. Преинкубация AD- τ ау (6 мк/мл) с мышинным IgG (60 мк/мл) не снижала опосредуемую AD- τ ау деполяризацию мембраны в кортикальных нейронах. D. Данные, показывающие, что IPN001 и IPN002 значительно снижали опосредуемую AD- τ ау деполяризацию мембраны (парный t-критерий *p<0.037; **p<0.009, ***p<0.003).

Пример 3. Иммунореактивность IPN001 и IPN002 к τ ау в CSF больных AD

Цереброспинальную жидкость (CSF) отбирали у 10 здоровых доноров (1 мл у каждого). Также отбирали CSF у 10 пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) (1 мл у каждого). Аликвоты пулов CSF сохраняли для анализа ELISA. 10 мл среды, кондиционированной кортикоидными нейронами, дифференцировали в течение 315 дней из "дауновских" индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Линию iPSC (8941.1) использовали в качестве контроля для полученных аффинной хроматографией изолятов CSF и аликвоту также оставляли для анализа ELISA. Для определения, действительно ли CSF содержит IPN002-реактивный τ ау, каждый из собранных образцов CSF и кондиционированные среды предварительно очищали на смоле с иммобилизованным IgG1 и затем элюат наносили на смолу с иммобилизованным IPN001. Смолы с IPN001 тщательно отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и связанные белки элюировали раствором 50 мМ глицина, 150 мМ NaCl, рН 2.3 и после элюирования нейтрализовали 1 М Tris, рН 8.3. Элюированные белки концентрировали на концентраторах YM10 и добавляли в буфер для образцов для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата (SDS-PAGE) и для Вестерн-блоттинга.

Для того чтобы определить, реагирует ли IPN002 с любой формой Тау в CSF, Вестерн-блот белка, элюированного с IPN002, исследовали с использованием IPN001, Santa Cruz Тау Н- 150 (aa 1-150) и с Dako Тау #A0024 антителом, которое реагирует с С-концом (aa 243-441) Тау. Результаты показаны на фиг. 4А-С.

Вестерн-блоттинг показал, что в IPN002 аффинно очищенном белке CSF как здоровых, так и больных AD имеются иммунореактивные полосы IPN001 (фиг. 4а) и Тау Н-150 (фиг. 4б), которые находятся в интервале молекулярной массы от ~25 до 37 кДа. Эти фрагменты Тау аналогичны по размеру, но не по своей относительной интенсивности, с фрагментами еТау, выделенными из среды, кондиционированной "дауновской" линией клеток. Антитело к Dako С-концевой Тау (фиг. 4с) не обнаружило каких-либо реактивных компонентов IPN002-аффинного изолята (изолята, аффинно очищенного на смоле с IPN002) как из CSF, так и кондиционированной среды. Полноразмерный Тау не обнаруживался ни одним из антител к Тау из IPN002-аффинного изолята. Так как IPN002-аффинно выделенные белки были реактивны по отношению к IPN001 и к IPN002 в Вестерн-блоттинге, был сделан вывод, что Тау в CSF также реактивен к IPN001.

Элюат CSF и кондиционированной среды с IPN002-аффинных смол затем последовательно наносили на и элюировали с T46 (Тау #428-441) и HT7 (Тау # 159-163), чтобы определить, присутствуют ли какие-нибудь С-концевые или срединные (внутренние) фрагменты Тау, которые не были выделены с помощью IPN002. Элюаты гибридизовали с Dako С-концевым антителом (фиг. 4С), но никакой иммунореактивности не было обнаружено. Эти результаты подтверждают, что Тау, иммунореактивный по отношению к IPN001 и IPN002, имеется в большем количестве, чем полноразмерный, только срединные или С-концевые фрагменты Тау.

Аликвоты элюатов каждой из CSFs и кондиционированных сред сохраняли для сравнения до (пре) и после (пост) выделения, чтобы определить, действительно ли весь детектируемый Тау был удален в процессе выделения, с использованием коммерчески доступного набора, обычно применяемого для определения уровней Тау в CSF. Результаты представлены на фиг. 5. Этот анализ показал, что весь детектируемый Тау был удален из пост-CSF образцов в процессе аффинного выделения.

Эти результаты дают строгое доказательство того, что как IPN001, так и IPN002 реагируют с компонентами Тау, присутствующими в CSF как здоровых, так и больных AD пациентов.

Пример 4. Обнаружение еТау в образцах, полученных от пациентов.

Материалы и методы.

Сбор сред, кондиционированных полученными из iPSC кортикальными нейронами.

iPSC (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки) получали от здоровых контрольных пациентов и пациентов с болезнью Альцгеймера соответствующих возрастных групп, используя метод Yamanaka (Takahashi et al. (2007), Cell 131(5), 861), как описано в публикации Dimos et al. (2008), Science, 321:1218. iPSC дифференцировали в кортикальные нейроны в основном в соответствии с опубликованными протоколами, применяя метод с двойным монослоем белков SMAD (Chambers et al. (2009), Nat. Biotechnol. 27:275), с последующей дифференцировкой в кортикальные нейроны, аналогично методу, описанному в публикации Shi et al. (2012), Nat. Neurosci. 15:477). Полученные из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN), культивированные в течение 108 дней, отмывали, добавляли свежую среду и, если не указано иное, через три дня собирали кондиционированную среду. Осуществляли несколько дифференцировок и использованием этих линий, чтобы гарантировать воспроизводимость уровней еТау. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, а затем проводили Вестерн-блоттинг или Тау ELISA. Для эксперимента с брефелдином А культуры iPSC-CN отмывали PBS, а затем добавляли свежую среду, содержащую или не содержащую 1 мкМ брефелдина, и среду кондиционировали в течение 1 ч, а потом собирали.

Сбор среды, кондиционированной человеческими первичными кортикальными нейронами.

Культуры человеческих кортикальных нейронов (НСС) готовили, как описано в публикации Wright et al. (2007), Neurobiol. Aging 28:226. Коротко говоря, человеческая эмбриональная ткань коры головного мозга была получена в Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA) и удовлетворяла федеральным установкам по исследованиям на эмбрионах и Акту об анатомическом дарении. Ткань отмывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro) и растирали в присутствии 1 мкг/мл ДНК-азы (EMD) и пропускали через клеточный фильтр с диаметром отверстий 100 мкм. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в 0.05% трипсин/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали, добавляя равный объем среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец осторожно растирали опять же в присутствии ДНК-азы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в среде для чашек Петри (нейробазальная среда Neurobasal, содержащая B27, Invitrogen) и считали. Клетки засеивали на плашки (планшеты) или на покровные стекла, покрытые поли-d-лизинном с ламинином. Трехнедельные НСС отмывали, добавляли свежую среду и после трех дней кондиционирования среду собирали. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, а затем анализировали методом Вестерн-блоттинга.

Сбор образцов Р301L мышинного ISF и человеческого CSF.

Мышам проводили анестезию с помощью изофлурана (2%, 800 мл/мин O₂). Для местного обезболи-

вания применяли бупивакаин/эпинефрин, а для пери/послеоперационного обезболивания применяли финадин. Животных помещали в стереотаксическую раму (Kopf instruments, USA). Зонды для микродиализа с системой двухтактной накачки (мембрана содержит фосфатидилэтанолламин (PEE, ФЭА), Brainlink, the Netherlands) вводили в гиппокамп (открытая (обнаженная) поверхность 3 мм). Отбор образцов для микродиализа проводили через 24 и через 48 ч после операции. В день отбора образцов зонды животных с помощью трубки из (полимера) фторированного этилен-пропилена (FEP) соединяли с микроперфузионным насосом (шприцевой насос Harvard PHD 2000 Syringe pump, Holliston, MA или аналогичный). Зонды для микродиализа перфузировали искусственной CSF (aCSF), содержащей 147 мМ NaCl, 3.0 мМ KCl, 1.2 мМ CaCl₂, 1.2 мМ MgCl₂ и 0.15% альбумина бычьей сыворотки (BSA), при скорости потока 0.75 мкл/мин. Образцы для микродиализа собирали в течение 60 мин. После периода стабилизации собирали базальные образцы. На второй день отбора образцов повторяли вышеописанную процедуру (Brains Online). Интерстициальную жидкость (ISF) центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин и прозрачные супернатанты использовали для eTau Вестерн-блоттинга.

Отбирали 10 мл CSF (Precision Med) у 10 здоровых (Precision Med), 10 AD пациентов (Precision Med) и 10 PSP пациентов, центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, супернатанты, предварительно очищенные на IgG-аффинной смоле с последующим выделением Tau на IPN002 (антитело к Tau) - аффинной смоле, отмывали, элюировали раствором 50 мМ глицина, pH 2.3, со 150 мМ NaCl в пробирку, содержащую 1 М TBS, pH 8.3 для нейтрализации pH, концентрировали на фильтрах YM10 и готовили для белкового (Tau) блоттинга (Вестерн-блоттинга). siPSC-CN-кондиционированную среду от пациента fAD PSEN1 аналогичным образом выделяли в качестве положительного контроля для сравнения характера полос.

Вестерн-блоттинг.

Кондиционированную среду разводили буфером Лэммли (Sigma). Культивированные нейроны отмывали в PBS, а потом инкубировали в 0.05% трипсине в DMEM (Invitrogen), отмывали и лизировали в буфере Лэммли. Все образцы кипятили, делили на трис-глицин-полиакриламидном геле (Invitrogen) и переносили на нитроцеллюлозу с помощью системы iBlot (Invitrogen). Мембраны инкубировали в блокирующем буфере (LiCor), выдерживали с 0.5 мкг/мл IPN001 антитела к Tau и с антителом к β-актину (1:2000; Abscam) в блокирующем буфере, содержащем 0.1% Tween-20, вторичными антителами к мышечному антителу 680 и кроличьему антителу 800 (LiCor). Блоты сканировали с помощью системы визуализации в ИК-области Odyssey SA и анализировали, используя программу Odyssey SA (LiCor).

ELISA Tau-полипептида.

Среду собирали после периода кондиционирования в течение трех дней из культур полученных из iPSC кортикальных нейронов и анализировали с помощью гомогенного анализа на основе технологии AlphaScreen™ для определения количества Tau. 10 мкг/мл акцепторных гранул AlphaLISA с антителом к Tau и 1 нМ биотинилированного антитела к Tau перемешивали с кондиционированной средой в течение ночи при комнатной температуре. При комнатной температуре в течение 30 мин прибавляли 40 мкг/мл донорных гранул со стрептавидином (Perkin Elmer) и считывали планшет на планшетном ридере Envision.

Очистка eTau.

Кондиционированную среду, собранную с iPSC-CN от AD пациентов, центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, супернатанты собирали и предварительно очищали на IgG-аффинной смоле. Предварительно очищенный супернатант пропускали через смолу с IPN002 антителом к Tau, отмывали и eTau элюировали раствором, содержащим 50 мМ цитрата натрия, pH 2.3 со 150 мМ NaCl, в пробирку, содержащую 1 М TBS, pH 8.3, для нейтрализации pH. Элюат концентрировали и буфер меняли на PBS.

Иммунофлуоресценция.

МСС отмывали в PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде, блокировали 10% нормальной ослиной сывороткой (Jackson ImmunoResearch) в PBS, пермеабелизировали (если специально не указано иное) с помощью 0.2% Тритон-х-100 в PBS в течение 15 мин и окрашивали, применяя IPN001 антитело к Tau, вторичным антителом осла к мышечному иммуноглобулину-A488 (Molecular Probes) и DAPI (Invitrogen). Изображения получали с помощью микроскопа Leica DMI 600 B с увеличением 40× с применением программ LAS AF (Leica). Конфокальные изображения получали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon).

Результаты.

Анализы проводили с целью обнаружить фрагменты eTau в различных жидкостях. Результаты показаны на фиг. 7. Как показано на фиг. 7, левый рисунок, эндогенный Tau секретируется кортикальными нейронами, полученными из человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (человеческих iPSC-кортикальных нейронов; iPSC-CN), и секретируемый Tau называется внеклеточным Tau или "eTau." Как показано на фиг. 7, второй рисунок слева, eTau присутствует также в кондиционированной среде после культивирования человеческих первичных нейронов (человеческих кортикальных клеток; "HCC"), это подтверждает, что eTau не является артефактом процесса iPSC-дифференцировки. Эти

фрагменты eTau были также обнаружены в лизатах нейронов, это дает основание полагать, что Tau расщепляется внутри нейронов перед секрецией eTau.

Как показано на фиг. 7, средний рисунок, аналогичные фрагменты Tau были обнаружены в интерстициальной жидкости (ISF) P301L Tau мышей, где полноразмерный Tau не был обнаружен ни в одной из систем. P301L мыши являются трансгенными по мутантной форме человеческого Tau, содержащего мутацию P301L; мыши P301L являются моделями таупатии у человека. См., например, Götz et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276:529; и Lewis et al. (2000), *Nature Genetics*, 25:402.

Как показано на фиг. 7, рисунки справа, уровни eTau повышаются в CSF от AD пациентов, и многие линии пациентов с наследственной AD (fAD) сравнивали с линиями здоровых пациентов. Как показано на фиг. 7, рисунки справа, eTau был обнаружен также в CSF пациентов с PSP.

Пример 5. eTau индуцирует гиперактивность нейрона.

Методы.

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч-кламп) на целых клетках кортикальных нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), культивированных на монослое нормальных человеческих астроцитов, проводили с использованием микропипетки (2-5 мОм, мΩ), заполненной раствором, содержащим (мМ): К-метилсульфат - 140, NaCl - 10, CaCl₂ - 1, Mg-ATP - 3; Na-GTP - 0.4, EGTA - 0.2, FIEPES - 10, фосфокреатин с скорректированным pH 7.3 и мОсм = 305. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl - 140, KCl - 2.5, MgCl₂ - 2, CaCl₂ - 2, Hepes - 10, D-глюкоза - 10, сахароза - 20. Корректировали pH 7.4, мОсм = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Нанесение eTau или eTau с ингибиторами, тетродоксином (Tocris), MK801 (Sigma), NBQX (Tocris) или с антителом к Tau IPN001, осуществляли с помощью микроперфузионной системы MiniQuirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме офлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при температуре 34-37°C.

Результаты.

Для того чтобы определить, может ли eTau изменять функцию нейрона, очищенный фрагмент eTau наносили на iPSC-CN или НСС. Результаты показаны на фиг. 8А-8С.

Как показано на фиг. 8А, добавление очищенного фрагмента eTau к этим нейронам стимулировало гиперактивность. Как показано на фиг. 8В, гиперактивность, индуцированная смесью eTau, ингибировалась тетродоксином (ТТХ) и NMDA и AMPA антагонистами рецепторов глутамата, MK801 и NBQX соответственно. ТТХ блокирует потенциалы действия в нервах за счет связывания с потенциал-зависимыми натриевыми каналами в мембранах нервных клеток. Эти данные подтверждают, что eTau-индуцированная гиперактивность нейронов зависит от действия потенциал-зависимого высвобождения глутамата. Напротив, как показано на среднем рисунке фиг. 8А, нанесение полноразмерного Tau не вызывало заметных (детектируемых) изменений активности нейронов даже при значительно более высоких концентрациях, это показывает, что индуцируемая eTau гиперактивность зависит от фрагментов Tau. Эти результаты по индуцируемой eTau гиперактивности дают веские основания предполагать, что в нейронах могла происходить мобилизация кальция. Для того чтобы определить, происходит ли мобилизация кальция в нейронах, проверяли воздействие eTau на мобилизацию кальция. Как показано на фиг. 8С, eTau-1a вызывает стойкую мобилизацию кальция. Этот тип гиперактивности нейронов, если он поддерживается при хроническом состоянии, например, таком как при AD, может привести к дисфункции нейронов посредством измененного возбуждения в синапсах и aberrантной стимуляции нейронов. eTau-1a включает аминокислоты 2-166 фетального Tau, т.е. аминокислоты 2-166 последовательности SEQ ID NO: 27.

Пример 6. Антитело к Tau снижает гиперактивность нейронов, опосредуемую eTau.

Электрофизиологические анализы проводили, как описано в примере 5. Оценивали воздействие IPN001 и IPN002 на опосредуемую eTau гиперактивность нейронов.

Как показано на фиг. 8D, IPN001 снижает опосредуемую eTau гиперактивность нейронов. Как показано на фиг. 19B, IPN002 снижает опосредуемую eTau гиперактивность нейронов.

Пример 7. Гуманизированные антитела к Tau.

Были получены гуманизированные варианты IPN002. Аминокислотные последовательности V_H доменов (участков) тяжелой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие V_H домен тяжелой цепи гуманизированных вариантов, показаны на фиг. 9-12. Аминокислотные последовательности V_H доменов легкой цепи гуманизированных вариантов 1-4 и нуклеотидные последовательности, кодирующие V_H домен легкой цепи гуманизированных вариантов, показаны на фиг. 13-16. Отличия аминокислотных последовательностей от аминокислотной последовательности IPN002 представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

V_H варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	VH Вариант 1	VH Вариант 2	VH Вариант 3	VH Вариант 4
3	H	H	H	Q	Q
19	K	R	R	R	R
40	T	A	A	A	A
42	D	G	G	G	G
44	R	G	G	G	G
66	Q	R	R	R	R
83	S	S	N	N	N
86	K	K	R	R	R
87	S	S	A	A	A
93	S	S	S	S	A
108	S	S	T	T	T

Таблица 5

V_k варианты

Положение аминокислоты	IPN002 (Исходное антитело)	Vk Вариант 1	Vk Вариант 2	Vk Вариант 3	Vk Вариант 4
3	L	L	V	V	V
7	T	S	S	S	S
14	S	T	T	T	T
17	D	Q	Q	Q	Q
18	Q	P	P	P	P
45	K	Q	Q	Q	Q
48	V	V	V	V	I
83	L	V	V	V	V
85	T	T	T	V	V
104	L	V	V	V	V

Ниже даются однобуквенные обозначения аминокислот:

- G - глицин (Gly),
- P - пролин (Pro),
- A - аланин (Ala),
- V - валин (Val),
- L - лейцин (Leu),
- I - изолейцин (Ile),
- M - метионин (Met),
- C - цистеин (Cys),
- F - фенилаланин (Phe),
- Y - тирозин (Tyr),
- W - триптофан (Trp),
- H - гистидин (His),
- K - лизин (Lys),
- R - аргинин (Arg),
- Q - глутамин (Gln),
- N - аспарагин (Asn),
- E - глутаминовая кислота (Glu),
- D - аспарагиновая кислота (Asp),
- S - серин (Ser),
- T - треонин (Thr).

Пример 8. Характеристика гуманизированных вариантов IPN002.

Величины относительной аффинности связывания с Тау для связывания с каждым из рекомбинантных Тау (рекомбинантный Тау из 383 аминокислот), а также с eТау 1a, eТау1b, eТау2, eТау3 и eТау4 для каждой из 16 комбинаций V_H#1-4 с V_k#1-4 антитела показаны в табл. 4, представленной на фиг. 17. Относительная аффинность связывания для каждого вида Тау и eТау находится в интервале от 121 до 1030 пМ для каждой из V_H/V_k комбинаций антитела. eТау 1a включает аминокислоты 2-166 фетального Тау, т.е. аминокислоты 2-166 последовательности SEQ ID NO: 27; а eТау 1b включает аминокислоты 2-196 и 217-228 фетального Тау, т.е. аминокислоты 2-196 и 217- 228 последовательности SEQ ID NO: 27. Аминокислотные последовательности eТау3 и eТау 4 приводятся на фиг. 20.

Для того чтобы получить абсолютную аффинность, а также значения K_{on} и K_{dis} для этих V_H/V_k человеческих антител, проводили анализ на платформе Octet с использованием Тау (рекомбинантный Тау, содержащий 383 аминокислоты). Значения K_D составили интервал от 42.6 до 2120 пМ. Для всех V_H/V_k вариантов значения K_{on} были высокими, а значения K_{dis} были низкими по отношению к Тау для каждого образца Тау. Данные приводятся в табл. 5, которая представлена на фиг. 18.

Для группы вышеописанных гуманизированных вариантов IPN002 были проведены дополнитель-

ные анализы. Как показано на фиг. 19А, три варианта, V_H2/Vk1, V_H2/Vk2 и V_H2/Vk3, использовались для Вестерн-блоттинга с различными модификациями для образцов, содержащих Тау. Образцы, содержащие Тау, включали iPSC-CN-кондиционированную среду; iPSC-CN лизаты; лизаты мозга больных AD; лизаты коры головного мозга мышей P301L Тау и лизаты мозга яванского макака. Результаты показывают, что вышеописанные варианты гуманизированного IPN002 являются реактивными по отношению к Тау в различных образцах.

У группы вышеописанных вариантов гуманизированного IPN002 проверяли способность снижать индуцированную eТау гиперактивность нейронов. Как показано на фиг. 19В, исходное антитело IPN002 и варианты V_H2/Vk1, V_H2/Vk2 и V_H2/Vk3 блокировали гиперактивность, индуцированную eТау.

Пример 9. Тестирование иммуногенности гуманизированных вариантов IPN002.

Было проведено определение иммуногенного потенциала гуманизированного антитела к Тау. Был использован анализ EpiScreen™. См., например, Jones et al. (2004), J. Interferon Cytokine Res. 24:560; и Jones et al. (2005), J. Thromb. Haemost. 3:991. Кинетические анализы на Т-клетках осуществляли, используя истощенные по CD8⁺ мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC); а пролиферацию Т-клеток определяли, вводя [³H]-тимидин в различные временные точки после добавления образцов тестируемого антитела.

PBMC выделяли из лейкоцитарной пленки группы здоровых доноров (например, из крови, отбираемой в течение 24 ч тестирования). Реакции Т-клеток на тестируемое антитело (например, гуманизированный вариант IPN002) сравнивали с их реакциями на стандартное антитело.

Для получения образца для испытаний очищенное тестируемое антитело (гуманизированный вариант IPN002) добавляли в культуры PBMC *in vitro* до конечной концентрации 50 мкг/мл в культуральной среде. В качестве контрольных образцов были включены клинический контроль антитела (положительный контроль) и контроль одной только культуральной среды (нестимулированный контроль). Образцы для испытаний (PBMC плюс тестируемое антитело) и контрольные образцы инкубировали в течение 8 дней при 37°C с 5% CO₂. На 5, 6, 7 и 8 день клетки в образцах для испытаний и в контрольных образцах суспендировали и переносили в лунки многолуночного культурального планшета. Образцы для испытаний и контрольные образцы выдерживали в импульсном режиме с 0.75 мкКи (микрорюри) [³H]-тимидина и инкубировали еще в течение 18 ч, а затем собирали на плоских фильтрах. Число импульсов в минуту (cpm) для каждой лунки определяли, считая сцинтилляцию.

Для анализа пролиферации использовали порог SI, равный или превышающий 2; образцы, индуцирующие пролиферативный ответ выше этого порога, считали позитивными. SI (индекс стимуляции) означает среднее число импульсов для тестируемого образца, деленное на среднее значение для нестимулированного контрольного образца.

Результаты показаны на фиг. 21А-С. Т-клеточная пролиферация у здоровых доноров отвечает на тестируемое гуманизированное IPN002 антитело. Собирали образцы PBMC из смешанных культур и определяли пролиферацию на 5, 6, 7 и 8 день после инкубации с испытуемыми образцами. Отклики пролиферации с SI ≥ 2.0 (p < 0.05), показанным пунктирной горизонтальной линией, которые были значительными (p < 0.05) при определении с использованием непарного t-критерия Стьюдента в двух выборках, считали положительными.

Как показано на фиг. 21А, тестируемое полностью гуманизированное антитело IPN002 имело низкий иммуногенный потенциал (ниже порога SI 2.0). На фиг. 21В показаны результаты, полученные с использованием эталонного химерного антитела, где эталонное химерное антитело имеет переменные области тяжелой и легкой цепи мышинового IPN002 и константную область человеческого IgG4; и на фиг. 21С показаны результаты, полученные с иммуногенным клиническим контрольным гуманизированным A33 антителом.

Пример 10. IPN002 снижает уровень фосфорилированного Тау *in vivo*.

Определяли влияние введения IPN002 на уровень Тау, фосфорилированного по аминокислотам 202 и 205.

Использовали P301L мышиную модель. Мыши P301L являются трансгенными по форме человеческого Тау, содержащего мутацию P301L; Мыши P301L являются моделями таупатии у человека. См., например, Götz et al. (2001), J. Biol. Chem. 276:529.

Мышам P301L (в возрасте 3-4 месяца) вводили 1) контрольный IgG; 2) PHF1 антитело к фосфорилированному Тау или 3) IPN002. IgG контроль и IPN002 антитела инъецировали интраперитонеально в концентрации 10 мг/кг в течение 4 недель; затем 20 мг/кг в течение последующих 4 недель. PHF1 вводили в концентрации 10 мг/кг в течение всего 8-недельного курса. На 60 день после начала введения антитела определяли уровень фосфорилированного Тау в гиппокампе. Результаты показаны на фиг. 22.

Тау, фосфорилированный по аминокислотам 202 и 205, обозначен как "AT8." Как показано на фиг. 22, обработка посредством IPN002 привела в результате к статистически значимому снижению нерастворимого фосфо-Тау (AT8) по определению методом ELISA (левый рисунок), и тенденции к снижению по определению с помощью Вестерн-блоттинга (правый рисунок) по сравнению с IgG контролем. В случае обработки PHF1 наблюдалась тенденция к снижению нерастворимого AT8, что подтверждает ре-

зультаты, полученные Chai et al. ((2011), J. Biol. Chem. 286:34457) и Boutajangout et al. ((2011), J. Neurochem. 118:658).

Пример 11. IPN002 снижает уровень свободного Тау как в ISF, так и в CSF.

Проводилось определение влияния введения IPN002 на уровни свободного Тау в CSF и интерстициальной жидкости (ISF). Мышей P301L обрабатывали, как описано в примере 10. Уровни свободного Тау в ISF, не связанного с IPN002, определяли с использованием IPN001. Как показано на фиг. 23, введение IPN002 снижало уровни свободного Тау (не связанного с IPN002) (левая панель) в ISF у P301L мышей, получавших IPN002.

Для того чтобы определить, действительно ли IPN002 снижает уровень свободного Тау в CSF в той же степени, что и в ISF, мышей P301L обрабатывали так, как описано в Примере 10, и определяли влияние введения IPN002 на уровень свободного Тау (не связанного с IPN002) в CSF получавших лечение мышей. Результаты приводятся на фиг. 24.

На левом рисунке фиг. 24 показаны уровни свободного Тау (не связанного с IPN002; обозначенного как "Свободный Тау (без IPN002)") в CSF непролеченных, получавших контрольный IgG, получавших PHF1 и получавших IPN002 мышей. Как показано на правом рисунке фиг. 24, уровни свободного Тау в CSF сопоставимы с уровнями свободного Тау в ISF мышей, получавших IPN002, это показывает, что наблюдается хорошая корреляция результатов анализа Тау в ISF с результатами анализа более клинически релевантного материала, CSF.

Пример 12. Антитело к Тау снижает гиперактивность нейронов, опосредованную eТау.

Электрофизиологические анализы проводили, как описано в примере 5. Определяли влияние IPN002 на гиперактивность нейронов, индуцируемую e-Тау.

Как показано на фиг. 25, IPN002 снижает опосредуемую eТау гиперактивность нейронов.

Пример 13. Тау-фрагменты присутствуют в CSF, полученной от субъектов с подозрением на хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ, ХТЭ).

Образцы CSF были получены от бывших нападающих форвардов Национальной Футбольной Лиги, у которых наблюдалось поведенческое/когнитивное расстройство и рассматривалось наличие у них с большой долей вероятности, СТЕ. Образцы CSF анализировали на присутствие фрагментов eТау. Фрагменты eТау выделяли аффинно из собранных CSF здоровых субъектов и субъектов с подозрением на СТЕ. Выделенные фрагменты eТау разделяли электрофорезом в акриламидном геле; разделенные фрагменты переносили на мембрану. Мембрану выдерживали с IPN001. Результаты, представленные на фиг. 26, показывают, что фрагменты Тау присутствуют в CSF, полученной от субъектов с подозрением на СТЕ.

Пример 14. Связывание гуманизованного варианта IPN002 с синтетическими тау-пептидами.

Связывание гуманизованного варианта IPN002 ("hu-IPN002") с синтетическим биотинилированным Тау-пептидом 1 и 2 анализировали как твердофазным, так и жидкофазным методом.

Ниже представлены аминокислотные последовательности пептида 1 и пептида 2:

пептид 1 (Тау аминокислоты 13-24): DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 49);

пептид 2 (Тау аминокислоты 15-44): AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK (SEQ ID NO: 50).

Антитело или биотинилированный пептид разводили фосфатно-солевым буферным раствором. Ниже даются конечные концентрации: 1 мкг/мл hu-IPN002; 1 мкг/мл rTau383 (pTau383, полноразмерный рекомбинантный Тау); 5 мкг/мл (биотинилированный пептид 1); и 5 мкг/мл (биотинилированный пептид 2). 100 мкл 0.1% казеина в PBS добавляли в лунки многолуночного планшета. Добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Делали серийные разведения. В лунки, содержащие серийные разведения антитела, добавляли 100 мкл конъюгата биотин-пептид. Многолуночный планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, конъюгированное со стрептавидин-пероксидазой хрена (HRP), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию останавливали, добавляя 100 мкл 1н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Результаты показаны на фиг. 27 и 28 и суммированы в табл. 6.

Таблица 6

	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-rTau383	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-Пептид 1	Hu-IPN002 кДа [M] w/ биотин-Пептид 2
твёрдофазный	1.071E-10	1.062E-10	2.777E-10
в растворе	1.135E-10	1.364E-10	3.698E-10

На фиг. 29 показано связывание hu-IPN002 с полноразмерным рекомбинантным Тау (rTau-383) и фосфатаза-активирующим доменным (PAD) пептидом (Тау аминокислоты 2-28; AEPRQE-

FEVMEDHAGTY; SEQ ID NO: 80). Как показано на фиг. 29, hu-IPN002 не связывает PAD пептид.

На фиг. 30 показано, что небитинилированный Тау пептид 1 (Тау аминокислоты 13- 24) и небитинилированный пептид 2 (Тау аминокислоты 15-44) конкурируют за связывание с hu-IPN002. Эти результаты показывают, что связывание Тау Пептида 1 и Тау Пептида 2 с hu-IPN002 является специфическим, а не результатом добавления биотина.

Пример 15. In vivo влияние IPN002 на патологию.

В данном исследовании изучалось действие терапевтического вмешательства на пониженную подвижность и Тау патологию у трансгенной мышшиной модели таупатии (hTau.P301L-Tg). У этих мышшей, клинический мутант человеческого Тау (P301L) экспрессируется под контролем промотора мышшиного *Thy1* (нейроспецифическая экспрессия). Поведение (тест на равновесие "прогулка по приподнятой перекладине") проверяли в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 месяцев, а также за день до окончания исследования. Конечные критерии оценки в исследовании включали (1) выживаемость; (2) поведение: результаты теста "прогулка по приподнятой перекладине" и оценка хватательного рефлекса; (3) биохимия: весь (общий) Тау в тотальном гомогенате, фракциях растворимых и нерастворимых белков ствола головного мозга; и (4) биомаркеры: АТ8 в тотальном гомогенате и во фракциях растворимых и нерастворимых белков ствола головного мозга.

Материалы и методы.

Мышам P301L (в возрасте 3-4 месяца) вводили 1) контрольный IgG; 2) PHF1 антитело к фосфорилированному Тау или 3) IPN002. Антитела IgG контроль и IPN002 вводили в виде интраперитонеальных (внутрибрюшинных) инъекций в дозе (концентрации) 20 мг/кг раз в неделю в течение 6 месяцев. PHF1 вводили в дозе 10 мг/кг в течение 6 месяцев. PHF1 представляет собой мышшиное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп, включающий фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴. Santacruz et al. (2005), *Science*, 309:476.

Масса тела и хватательный рефлекс.

Массу тела определяли еженедельно в течение исследования и после выведения из эксперимента (умерщвленные). Массу тела и оценку хватательного рефлекса регистрировали еженедельно с начала исследования до 7-месячного возраста. Начиная с 7 месяцев и далее проводили мониторинг дважды в неделю, проверяя двигательную активность в домашней клетке, потерю в весе и первые признаки хватательного рефлекса задних и передних лап. Как только появлялись симптомы хватательного рефлекса, массу тела измеряли ежедневно, а хватательный рефлекс оценивали до момента "преждевременного выведения из эксперимента" (умерщвления). Для оценки хватательного рефлекса мышшей держали примерно на 1.5 см выше основания хвоста около десяти секунд. Хватательный рефлекс оценивали по 4^x-балльной шкале отдельно для каждой лапы. Преждевременно выведенные из эксперимента (умерщвленные) мышши получали максимальную оценку. В качестве подтверждающего доказательства для решения об умерщвлении использовали прежде всего оценку хватательного рефлекса передних лап. Это решение основывалось на совместном изучении хватательного рефлекса, потери в весе и подвижности в домашней клетке и на стандартных критериях. Оценки левой и правой задних лап, объединенные в одну оценку хватательного рефлекса, использовали для оценки эволюции хватательного рефлекса в ходе эксперимента и оценку групповых различий в конце эксперимента. Мышей, которые умерли преждевременно вследствие эпилепсии, исключали из исследования. Статистический анализ проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с поправкой Бонферрони для post-hoc сравнений и t-критерий Стьюдента для средних по группе последних оценок хватательного рефлекса перед умерщвлением соответственно.

Прогулка по приподнятой перекладине.

Тест на равновесие, прогулку по приподнятой перекладине, проводили на мышшах в базовой группе (группе перед исследованием) и в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 месяцев, а также за день до окончания исследования, на мышшах в подопытных группах, для изучения двигательной дисфункции и усвоения двигательного навыка. Способность данной мышши сохранять равновесие на перекладине и время, необходимое для прохождения расстояния в 1 м является показателем их равновесия, координации, физического состояния и планирования моторики. Медную перекладину диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Начало перекладины было освещено настольной лампой, тогда как платформа (площадка) для внутреннего выхода помещалась в конце. Для начальных тренировочных исследований использовали более широкую перекладину, чтобы научить мышшей сохранять равновесие и ходить до платформы. После тренировочных испытаний измеряли время задержки (латентности) мышшей на расстоянии 1 м. Кроме того, с помощью наблюдения за походкой определяли первые симптомы двигательной дисфункции (скольжение лап и волочение живота). Статистический анализ оценок времени задержки осуществляли, используя двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с поправкой Бонферрони для post-hoc сравнений.

Результаты.

Хватательный рефлекс и тест на равновесие (прогулка по приподнятой перекладине).

Влияние IPN002 на хватательный рефлекс показано на фиг. 31. Как показано на фиг. 31, введение

IPN002 снижало баллы хватательного рефлекса по сравнению с контрольным IgG. Влияние IPN002 на двигательную функцию, определяемое с помощью теста "прогулка по приподнятой перекладине", показано на фиг. 32. Как показано на фиг. 32, введение IPN002 значительно снижало среднюю латентность (и, следовательно, улучшало двигательную функцию) по сравнению с контрольным IgG. Таким образом, введение IPN002 значительно снижает двигательный дефект у P301L Тау трансгенных мышей. С применением того же самого статистического метода было показано, что результаты введения PHF1 не достигли статистической значимости.

Уровни Тау.

Определяли уровень свободного Тау (Тау, не связанного с IPN002) в CSF мышей P301L после введения контрольного IgG, PHF1 или IPN002. Уровень в CSF свободного Тау, не связанного с IPN002, определяли с использованием IPN001. Результаты показаны на фиг. 33. Как показано на фиг. 33, введение IPN002 снижало уровни свободного Тау (не связанного с IPN002) на 96% по сравнению с уровнями у мышей, получавших контрольный IgG.

Пример 16. Влияние IPN002 на индуцированную eТау повышенную возбудимость нейронов.

Материалы и методы.

Локальную фиксацию потенциала (метод пэтч-кламп) на целых клетках проводили на культурах человеческих первичных кортикальных нейронов. Нейроны перфузировали (2 мл/мин) искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl - 140, KCl - 2.5, MgCl₂ - 2, CaCl₂ - 2, Hepes - 10, D-глюкоза - 10, сахароза - 20, корректировали pH 7.4 мОсм = 310. Показания снимали с применением программы для сбора данных pClamp-10.3 (Molecular Devices) и усилителя MultiClamp 700B (Axon Instrument; Foster City CA). Нанесение (струи): 1) eТау1а (аминокислоты 2-166); 2) фосфорилированного Тау или eТау с ингибиторами; 3) контрольного IgG или 4) антител к Тау PHF1, IPN001 или Dako (поликлональное антитело к С-концевому Тау) осуществляли с помощью микроперфузионной системы Minis-Quirt (AutoMate, Berkeley, CA). Анализ данных проводили в режиме офлайн с применением аналитической программы Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Все показания снимали при температуре 34-37°C.

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 34 и 35. Как показано на фиг. 34, IPN002 снижал индуцированную eТау1а гиперактивность нейронов. Ни контрольный IgG, ни "Dako" (поликлональное Ab к С-концевому Тау) не вызывали значительного снижения гиперактивности нейронов. Антитело PHF1 не снижало индуцированной eТау1а гиперактивности нейронов.

Влияние eТау1а на гиперактивность нейронов сравнивали с влиянием полноразмерного PHF1-реактивного фосфорилированного Тау (фосфо-Тау) на гиперактивность нейронов. Как показано на фиг. 35, средний рисунок, полноразмерный PHF1-реактивный фосфо-Тау не индуцировал гиперактивность нейронов в двух из трех тестируемых клеток; третья тестируемая клетка проявляла только небольшую нейронную гиперактивность по сравнению с базовой (верхний рисунок). Напротив, eТау1а индуцировал нейронную гиперактивность во всех трех проверенных клетках (нижний рисунок). Эти результаты графически показаны на фиг. 36.

Пример 17. Влияние IPN002 на уровни Аβ.

Материалы и методы.

Секреция Аβ полученными из iPSC кортикальными нейронами.

Полученные из iPSC кортикальные нейроны (iPSC-CN) культивировали *in vitro*. iPSCs получали от здоровых субъектов; субъектов с наследственной болезнью AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN1); субъекта с наследственной болезнью AD с мутацией в белке пресенилине (PSEN2) и субъекта со спорадической AD (sAD). После ~55-60 дней выращивания в культуре iPSC-CN сортировали по экспрессии L1-CAM (CD171), чтобы обогатить по зрелым кортикальным нейронам; отсортированные клетки выращивали в совместной культуре с нормальными человеческими астроцитами в течение 30 дней. После совместного культивирования в течение 30 дней iPSC-CN еще в течение 25 дней обрабатывали ингибитором фермента, расщепляющего белок-предшественник бета-амилоида (BACE), контрольным IgG или IPN002 в различных концентрациях, меняя среду 2X/неделя. Кондиционированную среду собирали и тестировали с применением высокочувствительного набора для анализа ELISA Millipore High Sensitivity Human Amyloid-beta 40 and Amyloid-beta 42 для обнаружения Аβ₁₋₄₀ ("Аβ40") и Аβ₁₋₄₂ ("Аβ42"). Аβ₄₀ и Аβ₄₂ являются продуктами расщепления белка-предшественника амилоида; сенильные бляшки содержат как Аβ₄₂, так и Аβ₄₀.

Секреция Аβ первичными человеческими кортикальными нейронами.

Человеческая фетальная кортикальная ткань, полученная в компании Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA), удовлетворяла федеральным установкам по исследованиям на эмбрионах и Акту об анатомическом дарении. Ткань отмывали в буферном солевом растворе Хэнка (Cellgro) и растирали в присутствии 1 мг/мл ДНК-азы (EMD) и пропускали через клеточный фильтр с диаметром отверстий 100 мкм. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в 0.05% трипсин/EDTA (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Трипсин инактивировали, добавляя равный объем среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), и образец осторожно растирали опять же в присутствии

ДНК-азы. После центрифугирования клетки ресуспендировали в среде для чашек Петри (нейробазальная среда Neurobasal, содержащая B27, Invitrogen) и считали. Клетки засеивали на плашки (планшеты), культивировали в течение 5 недель и добавляли свежую среду, содержащую антитела в заданной концентрации в течение 10 дней, меняя среду каждые 3-4 дня, кондиционированную среду собирали после 10 дней обработки. Кондиционированную среду центрифугировали при скорости 15,000 об/мин в течение 15 мин, а затем проводили анализ ELISA для обнаружения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 37-39.

Как показано на фиг. 37, обработка iPSC-CN антителом IPN002 снижала уровни $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$, секретируемых всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижал секрецию $A\beta_{40}$ или $A\beta_{42}$.

На фиг. 38 проиллюстрирована зависимость доза-эффект на примере зависимости количества $A\beta_{40}$, секретируемого первичными человеческими кортикальными нейронами, от дозы различных антител. Как показано на фиг. 38, инкубация первичных человеческих кортикальных нейронов с IPN001, IPN002 или hu-IPN002 (гуманизированный вариант IPN002) в концентрации 10 мкг/мл или 30 мкг/мл снижала количество секретируемого $A\beta_{40}$. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не оказывали никакого значительного влияния на количество секретируемого $A\beta_{40}$.

На фиг. 39 проиллюстрирована зависимость доза-эффект на примере зависимости количества $A\beta_{42}$, секретируемого первичными человеческими кортикальными нейронами, от дозы различных антител. Как показано на фиг. 39, инкубация первичных человеческих кортикальных нейронов с IPN001, IPN002 или hu-IPN002 (гуманизированный вариант IPN002) в концентрации 10 мкг/мл или 30 мкг/мл снижала количество секретируемого $A\beta_{42}$. Ни контрольный IgG, ни PHF1 не оказывали никакого значительного влияния на количество секретируемого $A\beta_{42}$.

Пример 18. Эпитопное картирование гуманизированного варианта IPN002.

Материалы и методы.

Антитело или биотинилированный пептид разводили фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Ниже даются конечные концентрации: 1 мкг/мл гуманизированного варианта IPN002 (hu-IPN002); 1 мкг/мл rTau383 (полноразмерного рекомбинантного Тау); 5 мкг/мл (биотинилированный пептид 1) и 5 мкг/мл биотинилированных пептидов. 100 мкл 0.1% казеина в PBS добавляли в лунки многолуночного планшета. Добавляли 150 мкл 1 мкг/мл раствора hu-IPN002. Делали серийные разведения hu-IPN002 и покрывали лунки многолуночного планшета. В лунки, содержащие серийные разведения антитела, добавляли 100 мкл конъюгатов биотин-пептиды или биотин-полноразмерный Тау. Многолуночный планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, конъюгированное со стрептавидин-пероксидазой хрена (HRP), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; а затем 2 раза в PBS.

Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию прекращали, добавляя 100 мкл 1н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 40. Данные, представленные на фиг. 40, показывают, что биотин-Тау 13-24, биотин-Тау 15-24, биотин-Тау 15-44 и биотин-фосфо-Тау 15-24 (с фосфорилированным Тау, соответствующим аминокислоте 18 полноразмерного Тау) и полноразмерный Тау (rTau383), все эффективно связываются с hu-IPN002. Таким образом, hu-IPN002 связывает эпитоп в пределах Тау аминокислот 15-24 вне зависимости от статуса фосфорилирования Тау-18.

Пример 19. Связывание антитела с Тау в CSF.

Было изучено связывание IPN002, PHF1, антитела, специфического к линейному фосфорилированному эпитопу, и контрольного антитела с Тау, присутствующим в CSF.

Был проведен анализ связывания, чтобы определить антитела, которые связывают Тау, присутствующий в CSF. Анализ схематически показан на фиг. 41. Контрольный IgG, поликлональное антитело, специфическое к линейному фосфорилированному эпитопу ("поли-Ab-C-терминальный Тау"), PHF1 или IPN002 наносили на лунки многолуночного планшета. Антитело разводили в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Далее даются конечные концентрации: 5 мкг/мл IPN002, IgG, PHF1 или поли-Ab-C-концевого Тау. В лунки многолуночного планшета добавляли 100 мкл 0.1% казеина в PBS. Добавляли 100 мкл человеческой CSF и инкубировали в течение 1 часа при RT. В лунки добавляли 100 мкл смеси конъюгатов биотин-ВТ2 + биотин-НТ7. ВТ2 представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 194-198 человеческого Тау. НТ7 представляет собой мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 159-163 человеческого Тау. Многолуночный планшет инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; с последующими 2 отмывками в PBS.

В лунки добавляли вторичное антитело, конъюгированное со стрептавидин-пероксидазой хрена (HRP) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После периода инкубации лунки отмывали 5 раз раствором 0.05% Tween 20 в PBS; с последующими 2 отмывками в PBS. Добавляли субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и инкубировали в течение 1-15 мин. Реакцию прерывали, добавляя 100 мкл 1н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Количественный анализ проводили с известными количествами полноразмерного фосфо-Тау или с известными количествами eТау1а (аминокислоты 2-166 Тау). Как показано на фиг. 41, нижний рисунок, анализ проводили с использованием полноразмерного Тау (нижний левый рисунок) или eТау-1а (нижний правый рисунок) в концентрациях 0, 0.16, 0.8, 4, 20 и 100 нг/мл. Как показано на фиг. 41, нижний левый рисунок, IPN002, поли-Ab-C-концевой Тау и PHF1 связывают полноразмерный Тау. Как показано на фиг. 41, нижний правый рисунок, только IPN002 связывает eТау1а.

Вышеописанный анализ проводили с целью проверить (тестировать) связывание антител поли-Ab-C-концевой Тау, PHF1 и IPN002 с Тау, присутствующим в человеческой CSF от 1) контрольных (здоровых) пациентов; 2) MCI пациентов; 3) пациентов с "мягкой" формой AD ("мягкая", "mild"); 4) пациентов с умеренной формой AD ("умеренная", "moderate"); и пациентов с тяжелой формой AD. Результаты показаны на фиг. 42. Как показано на фиг. 42, Тау, присутствующий в CSF, связывается с помощью IPN002, но не с помощью антитела pAb-Тау линейный эпитоп и не с помощью PHF1. Результаты показывают, что 1) N-концевые фрагменты Тау присутствуют в CSF; 2) полноразмерный Тау был обнаружен в CSF и 3) никаких C-концевых фрагментов Тау, которые включают BT2 и HT7 эпитопы, не было обнаружено в CSF.

Пример 20. In vivo действие антитела IPN002.

Результаты были получены в процессе шестимесячного изучения эффективности антитела к Тау на P301L Тау трансгенных мышах. Было обнаружено, что IPN002 глобально снижает прогрессирование заболевания, что показывают следующие наблюдения: резкое снижение уровня свободного Тау в CSF, пониженные уровни белкового маркера астроглиоза, уменьшение патологического Тау и фосфо-Тау эпитопов во многих областях головного мозга и улучшение показателей поведенческих/функциональных нарушений. IPN002 показал такие же или даже лучшие результаты, чем антитело к Тау PHF1. Наконец, было получено in vivo доказательство нового механизма действия секреторируемого Тау: регуляция уровня амилоида-бета по принципу положительной обратной связи. В данном исследовании четко показано различие способности антитела к eТау, IPN002, по сравнению с PHF1, модулировать уровни амилоида-бета.

Материалы и методы.

Исследования на животных.

В исследовании использовали P301L трансгенную мышиную модель. P301L трансгенная мышь содержит в качестве трансгена 4R2N изоформу человеческого Тау, мутантного по P301L, экспрессия которого направляется нейроспецифическим мышинным промотором гена Thy1 (нейроспецифическая экспрессия). У P301L трансгенной модели наблюдается возрастное гиперфосфорилирование Тау (AT8 и AT100) в спинном мозге, в стволе головного мозга, среднем мозге и в коре головного мозга. В молекуле гиперфосфорилированного Тау наблюдаются конформационные изменения, которые приводят к агрегации Тау, и у мышей появляются нейрофибрилярные клубки, начиная с 6 месяцев, хотя время начала колеблется в широких пределах. Одновременно с патологией у этих мышей постепенно развиваются двигательные дисфункции, такие как хватательный рефлекс задних лап, пониженная подвижность при прогулке по приподнятой перекладине (тест на равновесие), и требуется преждевременное умерщвление в возрасте 8-11 месяцев. Terwel et al. (2005), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 280:3963.

100 произвольно разделенным на группы мышам раз в неделю вводили i.p. антитело начиная с 3.5-месячного возраста в течение 6 месяцев до 9.5-месячного возраста. Результаты в группе, получавшей 20 мг/кг (mpk) IPN002, сравнивали с результатами в группах, получавших в качестве отрицательного контроля антитело, 20 mpk IgG1, и антитело к Тау, 10 mpk PHF1. PHF1 представляет собой мышиное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп, включающий фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴. Santacruz et al. (2005), Science, 309:476. У живых мышей проверяли выполнение теста на хватательный рефлекс и теста "прогулка по приподнятой перекладине". Мышей, у которых болезнь быстро прогрессировала в сторону последней стадии, преждевременно умерщвляли (до наступления 9.5-месячного возраста) в соответствии с установленными критериями. Извлекали сыворотку, CSF, гиппокамп, кору головного мозга, средний мозг и задний мозг; и сагиттальные срезы мозга делали для гистопатологии. Уровни антитела определяли в сыворотке и в CSF; определяли уровень тотального Тау и свободного Тау (Тау, не связанного с IPN002; "Тау, свободного от IPN002") в CSF; проводили биохимические/гистологические анализы на человеческий и мышиный Тау и анализировали мышиный амилоид-бета, воспалительный и синаптический белковый маркер и изменения экспрессии генов воспалительного, синаптического маркеров и маркеров нейрональной активности. Все анализы проводили слепым методом.

Число мышей, участвовавших в данном исследовании, составляло 25-33 мышей на подопытную группу и 10 на базовую группу. Всем мышам, зарезервированным для данного исследования, с помощью компьютера был присвоен случайный номер и определена обработка. Группы мышей представлены в

табл. 7.

Таблица 7

Группа	N	Линия	Обработка
1	10	hTau.P301L-Tg	Никакой (базовая группа)
2	32	hTau.P301L-Tg	20 mpk mIgG1 в носителе
3	25	hTau.P301L-Tg	10 mpk PHF1 в носителе
4	33	hTau.P301L-Tg	20 mpk IPN002 в носителе

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с установками биоэтики, которые полностью соответствуют международным требованиям к содержанию и использованию лабораторных животных. В табл. 8 приводятся показатели обработки.

Таблица 8

Путь введения	i.p.
Объём, концентрация дозы	10 мл/кг; 1 мг/мл; 10 mpk/день
Частота введения (обработки)	Один раз в неделю
Продолжительность обработки	Вплоть до 6 месяцев в зависимости от выживаемости
Отнесение к подопытной группе	Произвольное

Массу тела определяли раз в неделю в продолжение обработки и при умерщвлении. Хватательный рефлекс регистрировали еженедельно начиная с 7-месячного возраста и далее. Начиная с 7-месячного возраста и далее дважды в неделю проверяли подвижность в клетке, потерю в весе и первые признаки (симптомы) хватательного рефлекса задних лап.

Хватательный рефлекс. Для оценки хватательного рефлекса мышей держали за основание хвоста около 10 с. Хватательный рефлекс оценивали по 3-балльной шкале: 0. Задние лапы растянуты и пальцы вытянуты (разогнуты). 1. Одна задняя лапа частично втянута (сжата) >50% времени. 2. Обе задние лапы частично втянуты (сжаты) >50% времени. 3. Обе задние лапы полностью втянуты (сжаты) >50% времени. Хватательный рефлекс передней лапы получал оценку 0. Передние лапы вытянуты далеко вперед от тела. 1. Одна передняя лапа частично втянута (сжата) >50% времени. 2. Обе передние лапы частично втянуты (сжаты) >50% времени. 3. Обе передние лапы полностью втянуты (сжаты), неподвижны, атрофия мышечной ткани, мышья "молится". Мышей, у которых наблюдается резко выраженный хватательный рефлекс (в тяжелой форме), рано умерщвляли.

"Прогулка по приподнятой перекладине". Тест на равновесие, "прогулку по приподнятой перекладине" проводили в возрасте 7, 8, 8.5 и 9 и 9.5 месяцев для изучения двигательной дисфункции и усвоения двигательного навыка. Способность мыши сохранять равновесие на перекладине и время, необходимое для прохождения расстояния в 1 м является показателем их равновесия, координации, физического состояния и планирования моторики. Медную перекладину диаметром 12 мм помещали под углом 30°. Начало перекладины было освещено настольной лампой, а платформа (площадка) для внутреннего выхода помещалась на дальнем конце. После тренировочных испытаний измеряли время задержки (латентности) мышей. Кроме того, определяли скольжение лап и волочение живота.

Животных базовой группы умерщвляли перед началом исследования. Мышей в подопытных группах, у которых наблюдались резко выраженный хватательный рефлекс, пониженная масса тела и/или агональное состояние (агония), преждевременно умерщвляли (раннее умерщвление). Остальных мышей умерщвляли после обработки (исследования) в течение 6 месяцев (позднее умерщвление).

Таблица 9

Анестезия	Смесь кетамина, ксилазина 2%, атропина и физиологического раствора / изофлурана.
Перфузия	Осуществляли доступ к грудной полости для перфузии посредством транскардиальной перфузии ледяным физиологическим раствором в течение 3 минут через левый желудочек. Делали разрез правого предсердия в качестве пути оттока.
Левое полушарие	Разрезали на гиппокамп, кору, средний мозг, мозжечок, ствол мозга и остальное, замораживали в жидком азоте.
Правое полушарие	Постфиксировали в течение ночи в PBS с 4% параформальдегида и хранили в PBS с 0.1% азида натрия при 4°C.
CSF	Собирали через надрез в шейных мышцах между черепом и первым шейным позвонком. Большую цистерну прокалывали иглой 26, собирали 10-20 мкл CSF, центрифугировали при 10,000 об/мин при 4°C и хранили при -80°C.
Кровь/плазма	Собирали путём сердечной пункции в EDTA-пробирки, центрифугировали при 2000 об/мин и при 4°C 15 минут и хранили при -70°C.
Масса тела	Определяли после умерщвления.

Свободное антитело PHF1 в плазме количественно определяли, добавляя плазму в соответствующем разведении в планшеты, покрытые пленкой Tau, и детектируя методом ELISA с HRP-антителом к мышиному IgG и ТМВ. Чувствительность анализа свободного PHF1 была недостаточной для того, чтобы количественно определить уровни свободного PHF1 в CSF.

Свободное антитело IPN002, в плазме и в CSF, количественно определяли, добавляя плазму или

CSF в соответствующем разведении и детектируя методом ELISA с HRP-антителом к мышинному IgG и TMB.

Тотальный Тау в CSF количественно определяли методом ELISA сэндвич-типа, используя как сенсбилизацию антителом к Тау, так и обнаружение антител к Тау, которые, как было показано, не конкурируют ни с IPN002, ни с PHF1.

Свободный Тау (свободный от IPN002) в CSF количественно определяли гомогенным методом ELISA, используя два (иммобилизованных) антитела к Тау для захвата Тау в CSF. Одно из этих антител конкурирует с IPN002 и, следовательно, не будет реагировать с Тау, который предварительно был связан с IPN002, в CSF.

Гиппокамп и кору фракционировали гомогенизацией в 10 (weight?) объемах холодного TBS/коктейля ингибиторов протеаз/фосфатаз (Roche). Гомогенат получали, центрифугируя дебрис при 10,000 об/мин в течение 15 мин. Содержание белка BCA определяли на гомогенатах; все гомогенаты разводили до концентрации 1 мг/мл и соответствующие фракции разводили эквивалентно. Порцию гомогената центрифугировали 1 ч при скорости 100,000 об/мин при 4°C, получая растворимую фракцию (S1) и нерастворимый осадок (гранулы, пеллеты). Нерастворимые гранулы ресуспендировали в среде 1% раствор саркозила/коктейль ингибиторов протеаз/фосфатаз (Roche) и центрифугировали 1 ч при скорости 100,000 об/мин. Солюбилизованные с помощью саркозила супернатанты метили (P1); не солюбилизованный с использованием саркозила осадок ресуспендировали и метили (P2). Задний мозг фракционировали аналогичным способом, за исключением того, что для солюбилизации осадка P1 применяли раствор с высоким содержанием соли (0.85 M NaCl), а затем 1% раствор саркозила.

Гомогенный анализ ELISA человеческого Тау конкретно относится к человеческому p202/205 Тау, и он применялся для определения уровней человеческого Тау в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре и заднем мозге.

Гомогенный анализ ELISA человеческого AT8 конкретно относится к человеческому Тау, и он применялся для определения уровней человеческого AT8 в гомогенате, фракциях S1, P1 и P2 в гиппокампе, коре и заднем мозге.

SDS-PAGE с Вестерн-блот анализом с HT7, IPN001, Dako поликлональный-Тау, AT8, AT100, анти-p262, анти-p396 и AD2, GFAP, Iba1, синапсином проводили на фракциях гиппокампа, коры и/или заднего мозга (гомогенат, S1, P1 и/или P2). На каждый гель наносили один или более лизатов для контроля, чтобы гарантировать адекватную нормализацию гелей. Все полосы были нормализованы по β -актину в соответствующем образце гомогената. Антитела и их мишени показаны в табл. 10.

Таблица 10

Антитело	Мишень
IPN001	Тау и ϵ Тау
HT7	Человеческий Тау
Dako поликлональное к Тау	Человеческий и мышинный Тау
AT8	Человеческий и мышинный p202/205 (фосфорилированный по Ser202 и Thr205) Тау
AT100	Человеческий и мышинный p212 (фосфорилированный по Ser212) Тау
Анти-p262	Человеческий p262 (фосфорилированный по Ser262) Тау
AD2	Человеческий и мышинный p396 (фосфорилированный по Ser396) Тау
p396	Человеческий и мышинный p396 (фосфорилированный по Ser396) Тау
Глиофибрилярный кислый белок (GFAP)	Мышиный GFAP на астроцитах
Связывающая ионизированный кальций адаптерная молекула 1 (Iba1)	Мышиный Iba1 на микроглии
Синапсин	Мышиный синапсин (синаптический белок)

Для гистопатологии 6/32 рандомизированные сагиттальные срезы полушарий окрашивали на AT8 и AT100; сигналы проявляли с помощью DAB. Были сделаны количественные определения как на смежной с субталамическим ядром неопределенной зоне (bregma 2.08-1.12), так и на промежуточном ядре мозжечка (передняя и задняя доля), смежном латеральном ядре мозжечка (IntA/P/LAT; bregma 2.28-1.32) (слепая оценка).

Анализ ELISA мышинового амилоида-бета (как $A\beta_{40}$, так и $A\beta_{42}$) проводили для конкретного обнаружения $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ в гомогенатах мозга мышей. Анализ ELISA на белок $A\beta_{42}$ мыши был недостаточно чувствителен, чтобы надежно определить его уровни в гомогенатах мозга мышей. Анализ ELISA на мышинный $A\beta_{40}$ позволил определять уровни $A\beta_{40}$ в линейной области. Анализ ELISA мышинового $A\beta_{40}$ применяли для определения уровней $A\beta_{40}$ в гомогенатах и растворимых (S1) фракциях для всех групп.

Анализ TaqMap проводили на маркерах воспаления, синаптических маркерах и маркерах нейрональной активности. В табл. 11 представлен список маркеров.

Таблица 11

Ген	Функция
APP	Белок-предшественник бета-амилоида: мутантный/причинный у некоторых fAD пациентов
Человеческий Тау	MTB белок; агрегирует при AD
Arc	Нейрональная активность
Синапсин	Синаптический белок
Синаптофизин	Синаптический белок
Кальбиндин	Синаптический белок
Нейропептид Y	Нейрональная активность
Cox2	Воспаление
GFAP	Воспаление -астроцит
Iba1	Воспаление -микроглия
IL-1b	Воспаление
P67phox	Воспаление
Pg91phox	Воспаление
PBR1	Воспаление
TNFa	Воспаление

Статистика.

Статистический анализ лонгитюдных данных, полученных при изучении хватательного рефлекса и прогулки по приподнятой перекладине, проводился независимым специалистом по статистике. Коротко говоря, определяли (тангенс угла) наклон кривой для каждой мышцы как в тесте хватательного рефлекса, так и при прогулке по приподнятой перекладине, и эти коэффициенты применялись для того, чтобы определить, имеются ли значимые различия между группами. Множество методов применяется для определения наклона кривых и значимости. Для хватательного рефлекса эти методы включают Анализ завершенных данных лонгитюдным методом, Объединенную модель с корректировкой пропущенных данных и байесовский анализ упорядоченных лонгитюдных данных. Для прогулки по приподнятой перекладине эти анализы включали анализ завершенных лонгитюдных данных, Объединенную модель с корректировкой пропущенных данных, анализ с использованием 30-секундных значений лонгитюдных данных, байесовский лонгитюдный анализ с пропущенными данными и Alive, но не перекрестный анализ.

Статистический анализ по определению значимости для биохимии, гистологии и генной экспрессии проводили на целой группе, группах с ранним умерщвлением и с поздним умерщвлением с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением post-hoc теста Даннета. Применяли также t-критерий (критерий Стьюдента) для прогрессирования заболевания (группы: базовая, возраст 3.5 месяцев, по сравнению с подопытной, получавшей IgG, возраст 9.5 месяцев) в качестве "компаратора" значимости, полученной однофакторным дисперсионным методом, ANOVA. Когда для PHF1 или для IPN002, по-видимому, наблюдалась серьезная тенденция к изменениям, но этого не показывал однофакторный анализ ANOVA, t-критерий для сравнения IgG с PHF1 или IPN002 применяли единственно для того, чтобы определить, действительно ли выяснятся паттерны тенденции для этого конечного результата без достижения значимости однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Для того чтобы определить, какие из 116 конечных результатов лучше всего коррелируют друг с другом, применялась матричная корреляция; и "корреляторами", позволяющими достичь наивысшей корреляции, были ранжированные на основе их значений r^2 и значений p .

Результаты.

Уровни антител и достижение цели.

Перед умерщвлением отбирали плазму и CSF. Определяли уровни свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме и уровни свободного IPN002 в CSF. Анализ свободного PHF1 был недостаточно чувствителен для количественного определения уровней свободного PHF1 в CSF. Также было получено достаточно CSF для определения уровней как тотального Тау, так и свободного Тау (свободного от IPN002).

Уровни свободного IPN002 и свободного PHF1 в плазме.

P301L Тау трансгенным мышам вводили 20 mpk IgG, 20 mpk IPN002 или 10 mpk PHF1. Эти дозы были выбраны на основании результатов, полученных в пункте "Достижение цели", исследование № 1. Итоговые данные представлены в табл. 12.

Таблица 12

Антитело	Достижение цели Исследование №1		Исследование эффективности	
	Вводимая доза	Средние уровни свободного антитела (Плазма)	Вводимая доза	Средние уровни свободного антитела (Плазма)
IPN002	10 мрк в течение 4 недель-> 20 мрк в течение 4 недель	0.65 мкМ	20 мрк в течение 26 недель	0.9 +/- 0.26 мкМ
PHF1	10 мрк в течение 8 недель	0.65 мкМ	10 мрк в течение 26 недель	0.55 +/- 0.05 мкМ

Было найдено, что в исследовании № 1 пункта "Достижение цели", где после введения 10 мрк IPN002 в течение 4 недель вводили 20 мрк IPN002 еще в течение 4 недель, средний уровень свободного IPN002 в плазме составлял 0.65 мкМ. Такая же концентрация, 0.65 мкМ свободного PHF1, была получена при введении постоянной дозы 10 мрк PHF1 в течение 8 недель. В данном исследовании, как показано в табл. 12, средние концентрации в плазме были следующие: 0.55 мкМ свободного PHF1 и 0.9 мкМ IPN002. Таким образом, средние уровни в плазме свободного IPN002 были выше средних уровней свободного PHF1 в плазме.

Как показано в табл. 13, в среднем в CSF P301L Тау мышей, получавших IPN002, содержалось 0.9 нМ свободного IPN002. Это соответствует 0.1% свободного IPN002 в соотношении CSF:плазма; т.е. концентрация IPN002 в CSF составляла 0.1% от концентрации IPN002 в плазме (0.9 нМ в CSF; 0.9 мкМ в плазме). Значение 0.1% антитела в CSF согласуется с процентным содержанием, определенным для других антител, поступающих в мозг и попадающих ("сбрасываемых") в CSF после периферического введения. Однако анализ на свободный IPN002 дает сведения только об IPN002, который не связан с Тау. В CSF Тау связан с IPN002; следовательно, величина 0.1% ниже содержания тотального IPN002 в CSF. Расчеты, т.е. суммирование уровней свободного IPN002 и уровней IPN002, связанного с Тау, показывают, что уровни тотального IPN002 в CSF составляют ~0.2% от плазматических уровней. Как отмечалось в разделе "Методы", анализ на свободный PHF1 недостаточно чувствителен для количественного определения уровней свободного PHF1 в CSF.

Таблица 13

Антитело	Исследование эффективности	
	Средняя концентрация свободного антитела (Плазма)	Средняя концентрация свободного антитела (CSF)
Свободное IPN002	0.9 +/- 0.26 мкМ	0.9 +/- 0.28 нМ

Тотальный Тау в CSF.

Уровни тотального Тау в CSF количественно определяли для того, чтобы выяснить, действительно ли PHF1, либо IPN002 изменяют эти уровни или нет. Как показано на фиг. 43, уровни тотального Тау в CSF незначительно меняются при введении PHF1 или IPN002. Этот результат является ожидаемым на основании данных, полученных в исследовании Достижение цели.

Фиг. 43: Уровни тотального Тау в CSF P301L Тау трангенных мышей определяли количественно иммуоферментным анализом "сэндвич" ELISA антител к Тау. Как показано на фиг. 43, уровни Тау в CSF с возрастом заметно повышались (сравните уровень у 3-месячных мышей в базовой группе с мышным IgG). Ни PHF1, ни IPN002 не изменяли уровни тотального Тау.

Свободный Тау (от IPN002) в CSF.

Анализ на свободный Тау (от IPN002) в CSF, как описано в разделе "Методы", представлял собой анализ ELISA, в котором одно из двух антител к Тау конкурирует с IPN002; следовательно, анализ не позволяет обнаружить Тау, связанный с IPN002. Этот анализ показывает, действительно ли IPN002 поступил в мозг и в CSF и связался со своей мишенью (т.е. связался с Тау). Если IPN002 связался с мишенью, сигнал в анализе будет меньше (слабее). Этот анализ является специфическим к Тау, свободному от IPN002, и, следовательно, не обнаруживает свободный Тау (от PHF1). Как показано на фиг. 33, уровни свободного Тау (от IPN002) повышаются при прогрессировании заболевания, что согласуется с данными, представленными выше. PHF1 не влияет на уровни свободного Тау. Напротив, введение IPN002 привело в результате к уменьшению сигнала уровня свободного Тау (от IPN002) на 96%. Эти результаты показывают, что IPN002 полностью связан со своей мишенью, Тау в CSF.

Биохимическое и гистологическое исследование Тау и фосфо-Тау.

Как описано в разделе "Методы", гиппокамп, кора и задний мозг делили на фракции гомогенат, растворимую фракцию (солюбилизированную при участии саркозила) и нерастворимую фракцию (нерастворимую с помощью саркозила). Фракции анализировали как на человеческий, так и на мышинный Тау и на несколько эпитопов фосфо-Тау (AT8, AT100, p262, p396 и AD2), которые являются гиперфосфорилированными в мозгу больных, страдающих болезнью Альцгеймера. Как показано на фиг. 44A-H, введение IPN002 снижало уровни AT8 в гиппокампальном гомогенате (фиг. 44A), гиппокампальной

фракции S1 (фиг. 44B), гиппокампальной фракции P1 (фиг. 44C), гиппокампальной фракции P2 (фиг. 44D), кортикальном гомогенате (фиг. 44E) и кортикальной фракции P1 (фиг. 44G) по сравнению с введением мышинового IgG контрольного антитела. Данные, приведенные на фиг. 44A-H, показывают, что введение IPN002 снижало уровни AT8 до уровней, аналогичных результатам или превышающих результаты после введения (обработки) PHF1. Данные, показанные на фиг. 44A-H, были нормализованы по ВСА.

Как показано на фиг. 45A, обработка (введение) с помощью IPN002 снижала уровень человеческого p396-Тау во фракции S1 коры по сравнению с введением мышинового IgG, контрольного антитела. Как показано на фиг. 45B и 45C, введение IPN002 снижало уровень фосфо-Тау S262 в гомогенате коры (фиг. 45B) и в кортикальной фракции S1 (фиг. 45C) по сравнению с введением мышинового IgG, контрольного антитела. Как показано на фиг. 45D и 45E, введение IPN002 снижало уровень мышинового p396-Тау в кортикальной фракции S1 (фиг. 45D) и снижало уровень мышинового AT100 во фракции S1 коры (фиг. 45E) по сравнению с введением мышинового IgG, контрольного антитела.

Гистопатологию Тау (AT8 и AT100) изучали на двух отдельных ядрах в заднем мозге, на смежной с субталамическим ядром неопределенной зоне (STH) и на промежуточном ядре мозжечка (передняя и задняя доля), смежном латеральном ядре мозжечка (IntA/P/LAT). Как показано на фиг. 46, IPN002, у поздно умерщвленных мышей заметно увеличена AT8 болезненная патология. В случае PHF1 проявлялась тенденция к снижению, но не наблюдалось заметного улучшения гистопатологии Тау. Как показано на фиг. 47, введение IPN002 улучшило AT100 и MC1 патологию по сравнению с контрольным IgG.

Воспаление.

У моделей AD и таупатии развиваются как астроглиоз, так и микроглиоз. Однако, роль, которую играют в заболевании астроциты и микроглия, не совсем ясна. Если астроциты или микроглия активируются в P301L Тау трансгенных моделях, такая активация является следствием сверхэкспрессии мутантного Тау. Было высказано предположение, что секретируемый Тау вызывает AD патологию. Если секретируемый Тау вызывает AD патологию, тогда он также мог, предположительно, индуцировать активацию глиальных клеток. По этой причине изучался вопрос, повышено ли у P301L трансгенной мышинной модели содержание белков, уровень которых повышается при астроглиозе (GFAP) или микроглиозе (Iba1).

Как показано на фиг. 48A и 48B, уровни белка GFAP повышаются при прогрессировании заболевания как в гиппокампе, так и в коре. Эти результаты показывают, что либо астроциты активируются в гиппокампе и в коре, либо они инфильтровали эти участки мозга. Введение IPN002 значительно снижало уровни белка GFAP как в гиппокампе, так и в коре; это демонстрирует, что введение IPN002 снижало обусловленное заболеванием увеличение (выраженности) астроглиоза. PHF1 заметно снижал уровни GFAP в гиппокампе, но не в коре.

Уровни белка Iba1, маркера микроглии, количественно определяли как в гиппокампе, так и в коре. Как показано на фиг. 49A и 49B, уровень Iba1 при прогрессировании заболевания не повышается в гиппокампе, но повышается в коре. Введение IPN002 не влияло на болезненный рост уровней белка Iba1. Напротив, обработка с помощью PHF1 значительно снижала уровни белка Iba1. Эти результаты дают основание предположить, что механизмы действия IPN002 и PHF1 различны.

Модуляция уровня амилоида-бета.

Как показано в примере 17, обработка iPSC-CN антителом IPN002 снижала уровни A β ₄₀ и A β ₄₂, секретируемых всеми iPSC-CN, тогда как контрольный IgG не снижал секрецию A β ₄₀ или A β ₄₂. Затем определяли, действительно ли IPN002 также модулирует уровни A β in vivo. У мышинной модели P301L отсутствует сверхэкспрессия человеческого APP; поэтому количественно определяли уровни мышинового A β . Чувствительность анализа ELISA на мышинный A β ₄₂ была недостаточной для измерения уровней A β ₄₂ в этих гомогенатах. Однако анализ A β ₄₀ ELISA был достаточно чувствителен, и поэтому его применяли для определения уровней мышинового A β ₄₀ во фракциях гомогената и супернатантов. Уровни мышинового A β ₄₀ повышаются при прогрессировании заболевания. Наблюдаемое повышение уровней A β ₄₀ могло быть тау-зависимым и/или могло зависеть от возраста. Как показано на фиг. 50A и 50B, обработка с помощью IPN002 снижала уровни A β ₄₀ как в гомогенате (фиг. 50A), так и в растворимой фракции (фиг. 50B).

Результаты, представленные на фиг. 50A и 50B, показывают, что сверхэкспрессия Тау (возможно, связанная со старением) вызывает обусловленное прогрессированием заболевания повышение уровней A β ₄₀. Данные наводят на мысль, что секретируемый Тау является причинным фактором, вызывающим рост уровней A β , который IPN002, в свою очередь, ингибирует, блокируя функцию eТау. И напротив, антитело PHF1, не являющееся антителом, связывающим eТау, не оказывает никакого влияния на уровни A β .

Двигательная функция.

Определяли влияние введения IPN002 на двигательную функцию, проводя тесты "хватательный рефлекс" и "прогулка по приподнятой перекладине". Результаты представлены на фиг. 31, 32, 51 и 52.

Как показано на фиг. 31, введение IPN002 улучшало оценки хватательного рефлекса по сравнению

с мышинным IgG, контрольным антителом.

Как показано на фиг. 32 и 51, введение IPN002 улучшало средние результаты латентности (запаздывания) в тесте "прогулка по приподнятой перекладине" (фиг. 32) и снижала процент мышей, которые не могли пройти по перекладине (фиг. 51), по сравнению с мышинным IgG, контрольным антителом.

Пример 21. Эпитопное картирование.

Анализы связывания с пептидами и конкурентные анализы проводили, как описано выше, в примере 18.

Были использованы следующие пептиды:

IPIG-1: EVMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 81; аминокислоты 9-24 Тау);

IPIG-2: DHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 49; аминокислоты 13-24 Тау);

IPIG-3: AGTYGLGD (SEQ ID NO: 82; аминокислоты 15-22 Тау);

IPIG-4: AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK (SEQ ID NO: 50; аминокислоты 15-44 Тау);

PAD пептид: AEPRQFEVMEHDHAGTY (SEQ ID NO: 80; аминокислоты 2-18 Тау).

Результаты показаны на фиг. 53-55.

На фиг. 30 показано, что небиотинилированные тау-пептиды конкурируют за связывание с биотинилированными формами Тау. На верхнем рисунке показана конкуренция биотинилированного Тау 13-24 пептида (IPIG-2; SEQ ID NO: 49) с небиотинилированным Тау 13-24 за связывание с hu-IPN002.

На фиг. 52 показано, что полноразмерный Тау, IPIG-1, IPIG-2 и IPIG-4 связывались антителом hu-IPN002. IPIG-3, в молекуле которого отсутствуют остатки 23 и 24, не связывались с антителом hu-IPN002, так же как и PAD. Следовательно, остатки 23 и 24, по-видимому, необходимы для связывания с антителом hu-IPN002.

На фиг. 53 показано, что eТау-4 пептид связывает hu-IPN002; однако, пептиды PAD (Тау 2-18), Тау 15-22, Тау 19-28 и Тау 21-31 не связывали hu-IPN002.

Эти результаты показывают, что остатки 15-24, по-видимому, необходимы для связывания с антителом hu-IPN002.

Пример 22. Влияние синтетического eТау4 на уровни A β ₄₀ и A β ₄₂ в HFNs.

Определялось воздействие синтетического eТау4-полипептида на продуцирование A β ₄₀ и A β ₄₂ человеческими фетальными нейронами (HFNs). HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей 500 нМ eТау4 (SEQ ID NO: 48), 1 мкМ рекомбинантного Тау-383 или контрольного полипептида-имитатора, мнимого полипептида ("mock"), в течение 5 дней (d05), 10 дней (d10), 15 дней (d15) или 20 дней (d20). Количество A β ₄₀ и A β ₄₂ в культуральной среде определяли, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 55A и 55B.

Как показано на фиг. 55A, количество A β ₄₀ в 15-дневной и в 20-дневной HFNs-кондиционированной среде уменьшалось в случае HFNs, которые обрабатывались с помощью 500 нМ eТау4. Как показано на фиг. 55B, количество A β ₄₂ в 15-дневной и в 20-дневной культуральной среде от HFNs повышалось в случае HFNs, которые обрабатывались с применением 500 нМ eТау4.

Пример 23. Воздействие антител к Тау на уровни A β ₄₀ и A β ₄₂ в HFNs.

Было изучено влияние антител к Тау на продуцирование A β ₄₀ и A β ₄₂ в клетках HFNs. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела к Тау или контрольные антитела в конечной концентрации 30 мкг/мл, в течение 20 дней.

Ниже представлены контрольные антитела и антитела к Тау:

- 1) mo IgG (неспецифический мышинный IgG);
- 2) hu IgG (неспецифический человеческий IgG);
- 3) IPN002 (антитело к Тау, которое распознает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61);
- 4) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002);
- 5) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002 v1);
- 6) гуманизированный вариант IPN002 (hu-IPN002 v2);
- 7) TNT-1 - мышинное моноклональное антитело, полученное при использовании Тау 2-18 пептида в качестве иммуногена (см., например, Kanaan et al. ((2011), J. Neurosci. 31:9858)), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;
- 8) 5A6 - мышинное моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознает эпитоп в пределах аминокислот 19-46 Тау (см., например, Horowitz et al. (2004), J. Neurosci. 24:7895), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;
- 9) MC1 - мышинное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп в пределах аминокислот 28-126 Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;
- 10) HT7 - мышинное моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознает эпитоп, который включает аминокислоты PPGQK (аминокислоты 159-163 Тау; см., например, патент США

№ 7387879) Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;

11) BT2 - мышинное моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознает эпитоп, который включает аминокислоты RSGYS (аминокислоты 194-198 Тау; см., например, патент США № 6232437) Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;

12) Таи5 - мышинное моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознает эпитоп в пределах Ser²¹⁰-Arg²³⁰ (см., например, Carmel et al. (1996), J. Biol. Chem. 271:32789), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;

13) IPN008 - антитело к Тау, которое распознает эпитоп в С-концевой области Тау;

14) PHF1 - мышинное моноклональное антитело, которое, как сообщалось, распознает эпитоп, который включает фосфо-Ser³⁹⁶ и фосфо-Ser⁴⁰⁴ (см., например, Santacruz et al. (2005), Science, 309:476), где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61;

15) DC39n1 - мышинное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп в пределах 2N вставки Тау;

16) DA31 - мышинное моноклональное антитело, которое распознает эпитоп в пределах аминокислот 150-190 Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61; и

17) Dako - поликлональное антитело, которое распознает эпитоп в пределах аминокислот 243-441 Тау, где за основу нумерации аминокислот взята 2N4R аминокислотная последовательность, изображенная на фиг. 61.

Схематическое изображение локализации эпитопов, распознаваемых различными антителами, представлено на фиг. 59. На фиг. 61 показано выравнивание аминокислотной последовательности eТау4, которая не включает 2N вставку, с аминокислотной последовательностью 2N4R формы Тау, которая не включает 2N вставку (аминокислоты с 45 по 102 2N4R Тау).

В конце 20-дневного периода выращивания количество A β ₄₀ и A β ₄₂ в культуральной среде определяли, как описано выше. Результаты представлены на фиг. 56A и 56B.

Как показано на фиг. 56A, антитела, специфические к эпитопу в пределах аминокислот 2-68 eТау, снижают продуцирование A β ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на фиг. 56B, антитела, специфические к эпитопу в пределах аминокислот 2-68 eТау, снижают продуцирование A β ₄₂ в клетках HFNs.

Изучалось воздействие антитела к Тау DA31 на продуцирование A β ₄₀ и A β ₄₂ в клетках HFNs. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела к Тау или контрольные антитела в конечной концентрации 30 мкг/мкл, в течение 20 дней. Результаты показаны на фиг. 57A и 57B.

DA31 означает мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 150-190 Тау (нумерация на основе последовательности 2N4R Тау, изображенной на фиг. 61). Как показано на фиг. 57A, антитело DA31, но не HT7 (антитело, специфическое к эпитопу в пределах аминокислот 159-163), снижало продуцирование A β ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на фиг. 57B, антитело DA31, но не HT7, снижало продуцирование A β ₄₂ в клетках HFNs.

Изучалось воздействие антител к Тау на продуцирование A β ₄₀ и A β ₄₂ во времени. HFNs выращивали в культуральной среде, содержащей различные антитела, описанные выше, в течение 5 дней (d5), 10 дней (d10), 15 дней (d15), или 20 дней (d20). Проверляли действие контрольного IgG, MC1, IPN002, PHF1 и DC39n1 ("N1 вставка"). DC39n1 означает мышинное моноклональное антитело, которое связывает эпитоп в пределах 2N инsertов Тау (например, в пределах аминокислот 45-102 аминокислотной последовательности 2N4R Тау, изображенной на фиг. 61). В конце периода выращивания количество A β ₄₀ и A β ₄₂ в культуральной среде определяли, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 58A и 58B.

Как показано на фиг. 58A, MC1 и IPN002, но не PHF1 и не DC39n1, снижали продуцирование A β ₄₀ в клетках HFNs. Как показано на фиг. 58B, MC1 и IPN002, но не PHF1 и не DC39n1, снижали продуцирование A β ₄₂ в клетках HFNs.

Пример 24. Влияние гуманизованного варианта IPN002 на уровни A β в CSF нечеловеческих приматов.

Изучалось влияние hu-IPN002, гуманизованного варианта IPN002, на уровни A β в CSF нечеловеческих приматов. Самцам яванского макака (*Macaca fascicularis*) медленно вводили единичную болюсную инъекцию антитела hu-IPN002 с уровнем дозы 5 мг/кг или 20 мг/кг. Образцы спинномозговой жидкости (CSF) собирали в различные временные точки после инъекции. В образцах CSF количественно определяли A β ₄₀ с помощью коммерчески доступного анализа ELISA. Результаты показаны на фиг. 60. Представлены средние значения для всех образцов, собранных в конкретных временных точках (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

Как показано на фиг. 60, единичная инъекция 20 мг/кг hu-IPN002 снижала уровень A β ₄₀ в CSF примерно через 150 ч. Уровень A β ₄₀ в CSF продолжал падать примерно до 350 ч.

Хотя настоящее изобретение описано на конкретных примерах, специалисты в данной области тех-

ники понимают, что можно внести различные изменения и можно заменить на эквиваленты, не отступая от истинной сущности и в пределах объема изобретения. Кроме того, можно сделать множество модификаций, чтобы адаптировать конкретные ситуацию, материал, химическое соединение, способ, стадию или стадии способа к целям, сущности и объему настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения уровней $A\beta_{40}$ и/или $A\beta_{42}$ в нервной клетке и/или во внеклеточной жидкости субъекта, являющегося человеком, при этом способ включает введение субъекту, являющемуся человеком, гуманизованного антитела к Тау-полипептиду, которое специфически связывает эпитоп в пределах аминокислот 15-24 Тау-полипептида.

2. Способ по п.1, в котором антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 41.

3. Способ по п.1 или 2, в котором введение является внутривенным введением.

4. Способ по п.1 или 2, в котором введение является интратекальным введением.

Последовательности тяжёлой цепи гибридного антитела IPN001

```

1   E V Q L V E S G E D L V K P G G S L K L
2   GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGAAGAC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC CCTGAAACTC
61  S C V A S G F A F S S Y G M S W V R Q T
    TCCTGTGTCTG STTCTGGATT CGCTTTCAGT AGCTATGGCA TGTCTTGGGT TCGCCAGACT
121 P D M R L E W V A T I S S S G S R T Y F
    CCAGACATCA GGCTGGAGTG GGTCCGAACA ATTAGTAGCA GTGGTAGTCG CACCTACTTT
181 P D S V K G R L T I S R D N D K N I L Y
    CCAGACAGTG TGAAGGGGCG ACTCACCATC TCCAGAGACA ATGACAAGAA CATCCTATAC
241 L Q M S S L R S E D T A M Y Y C T I T W
    CTACAAATGA GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ACTATTGTAC GATTACCTGG
301 D G A M D Y W G R G I S V T V S S (SEQ ID NO:14)
    GACGGTGCTA TGGACTACTG GGTCTCTGGA ATATCAGTCA CCGTCTCTTC A (SEQ ID NO:18)
  
```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Фиг. 1А

Последовательности лёгкой цепи гибридного антитела IPN001

```

1   D V L M T Q T P L S L A V N L G D Q A S
    GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCGCTCTCC CTGGCAGTCA ATCTTGGAGA TCAAGCCTCC
61  L S C R S S Q T I L H S N G N T Y L E W
    CTCTCTTGCA GATCGAGTCA GACTATTTTA CATAGTAATG GAAATACCTA TTTAGAATGG
121 Y L Q K P G Q S P R L L I Y K V S K R F
    TATTTCAGCA AACCAGGCCA GTCTCCAAGA CTCTGATCT ACAAAGTTTC TAAACGATTT
181 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
    TCTGGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GATCAGGGA CAGATTTCAC ACTCAAGATC
241 S R V E A D D L G I Y Y C F Q G S L V P
    AGCAGAGTGG AGGCTGACGA TCTGGGAATT TATTACTGCT TTCAAGGTTTC ACTTGTCTCT
301 W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:13)
    TGGGCGTTCC GTGCAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:17)
  
```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Фиг. 1В

Последовательности лёгкой цепи гибридного антитела IPN002

```

1   E V H L V E S G G A L V K P G G S L K L
   GAGGTTTCATC TGGTGGAGTC TGGGGGAGCC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC CCTGAAACTC
61  S C A A S G F S F S K Y G M S W V R Q T
   TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CAGTTTCAGT AAATATGGCA TGCTTTGGGT TCGCCAGACT
121 P D K R L E W V A T I S S S G S R T Y Y
   CCAGACAAGA GGCTGGAGTG GGTCCGAACC ATTAGTAGTA GTGGGAGTCG CACCTACTAT
181 P D S V K G Q F T I S R D N A K N T L Y
   CCAGACAGTG TGAAGGCCA ATTCCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCCTGATC
241 L Q M S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
   CTGCAAAATGA GCAGCTGAA GTCTGAGGAC ACAGCCATGT ATTACTGTTC AATTAGCTGG
301 D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:16)
   GACGGTGCTA TGGACTACTG GGGTCAAGGG ACCTCAGTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO:20)

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Фиг. 2А

Последовательности тяжёлой цепи гибридного антитела IPN002

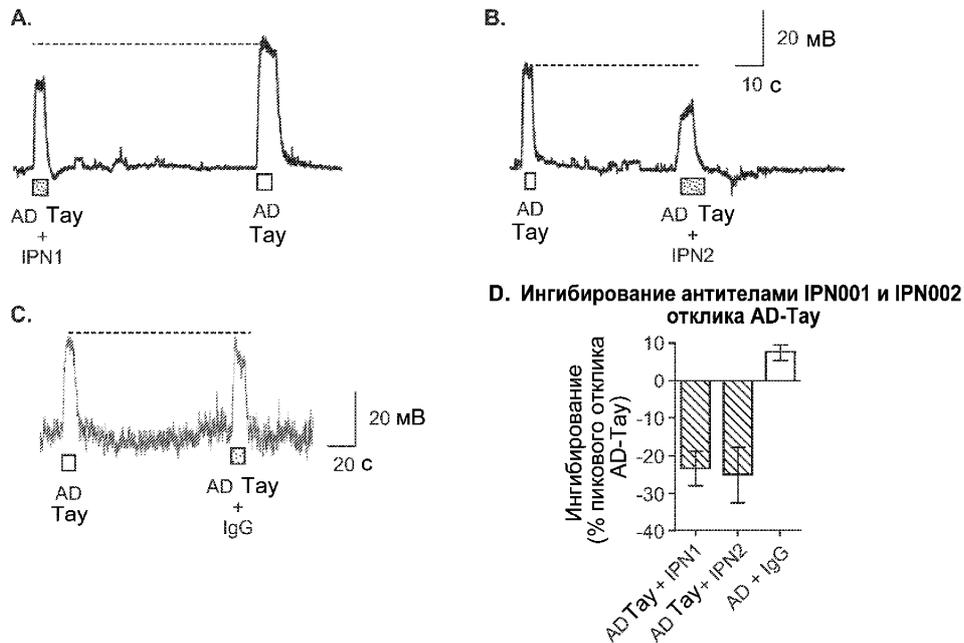
```

1   D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S
   GAIGTTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGGAGA TCAAGCCTCC
61  I S C K S S Q S I V H S N G N T Y L E W
   ATCTCTTGCA AATCTAGTCA GAGCATTGTA CATAGTAATG GAAACACCTA TTTAGAAATGG
121 Y L Q K P G Q S P K L L V Y K V S N R F
   TACCTGCAGA AACCCAGCCA GTCTCCAAAG CTCCTGGTCT ACAAAGTTTC CAATCGATTT
181 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
   TCTGGGCTCC CAGACAGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTAC ACTCAAGATC
241 S R V E A E D L G T Y Y C F Q G S L V P
   AGCAGAGTGG AGCCTGAGCA TCTGGGAAC TATTACTGCT TTCAAGTTTC ACTTGTTCCT
301 W A F G G G T K L E I K (SEQ ID NO:15)
   TGGGCGTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO:19)

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Фиг. 2В

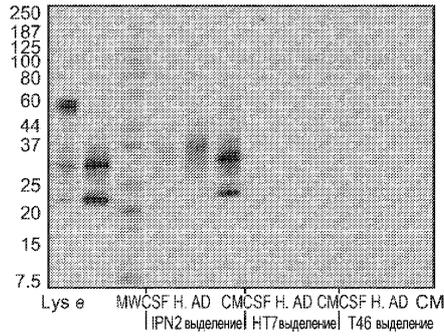


Фиг. 3

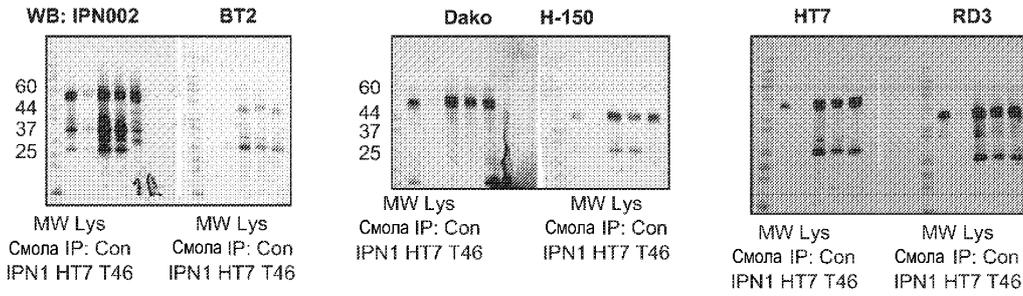
Аффинное выделение Тау из CSF



Вестерн-блоттинг IPN001

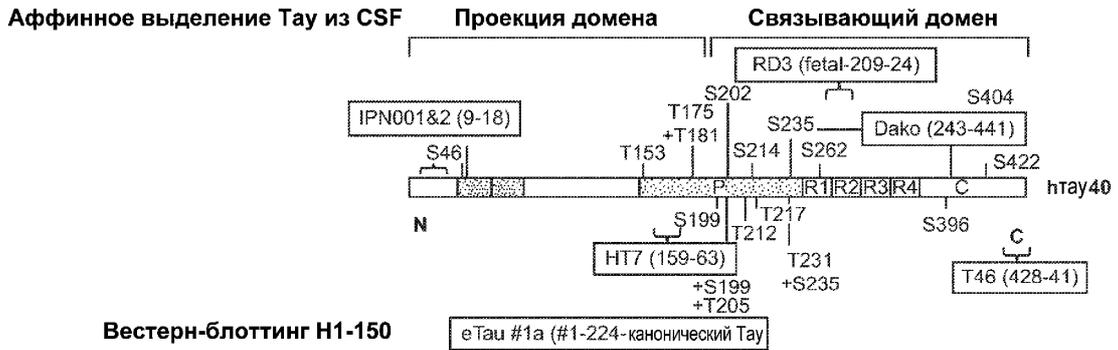


- Иммунореактивные фрагменты Тау IPN001+ IPN002 имеются в CSF здоровых и больных AD
- Изменённые количества по сравнению с CM
- Множественные идентифицированные фрагменты
- Не обнаружены ни полноразмерные, средние, ни С-концевые фрагменты

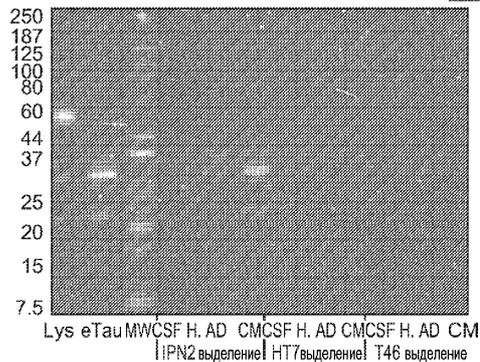


Фиг. 4А

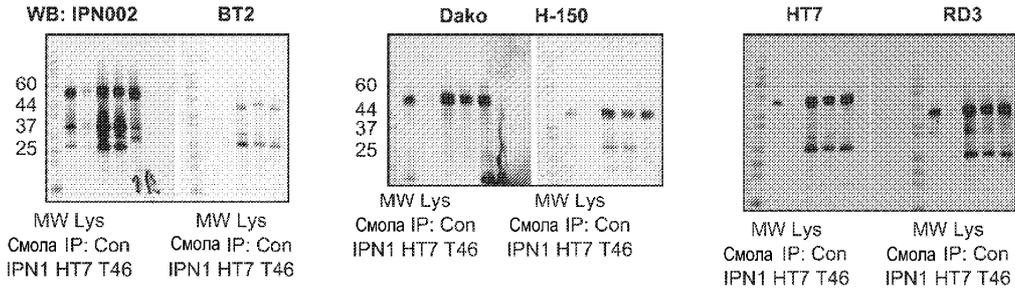
Аффинное выделение Тау из CSF



Вестерн-блоттинг H1-150

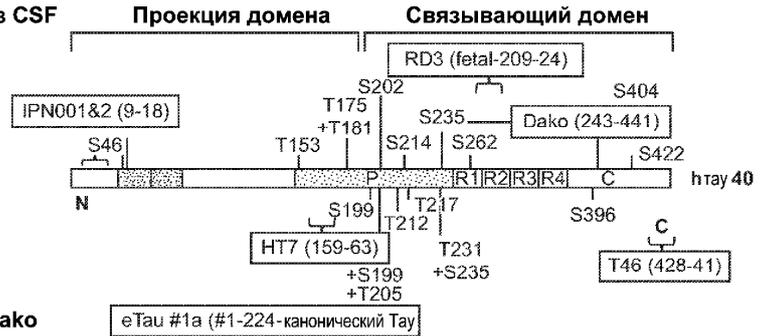


- Дополнительная кросс-реактивность N-концов антитела к Тау подтверждает наличие Тау с N-концами в CSF.
- Средние участки (захваченные N-концы или С-концы) Тау не обнаружены

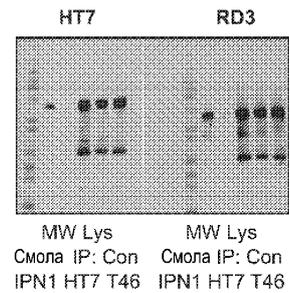
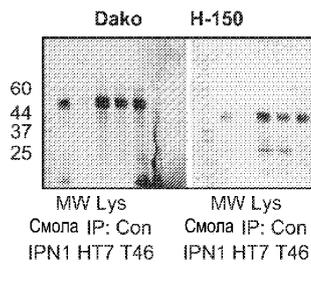
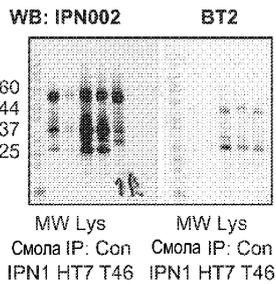
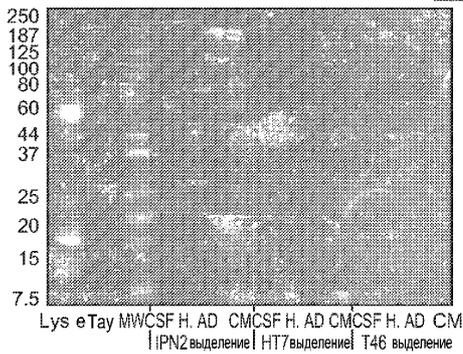


Фиг. 4B

Аффинное выделение Tau из CSF

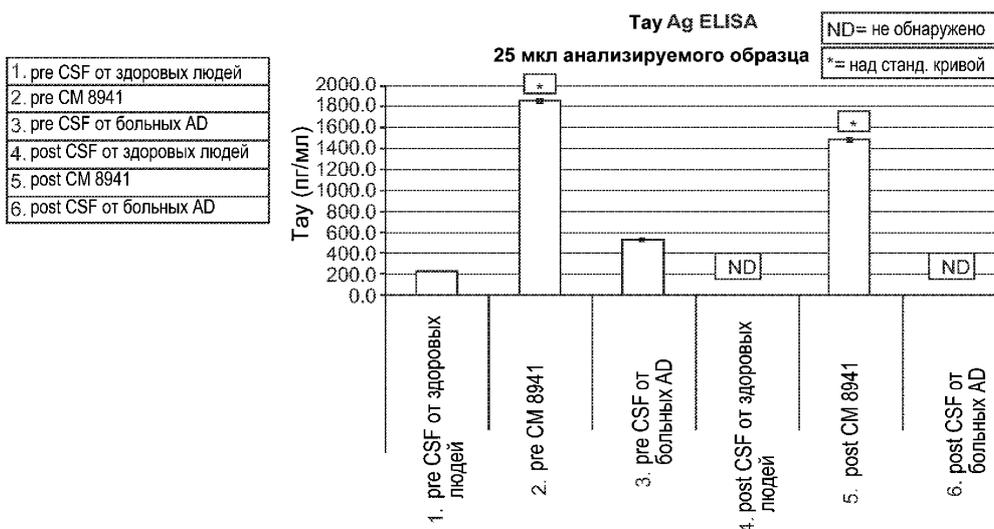


Вестерн-блоттинг Dako



Фиг. 4C

Количественный анализ CSF и CM до и после аффинного выделения Tau



Фиг. 5

Изоформы Tau человека

Изоформа 2	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQIPTEDGSEEPG	60
Изоформа 3	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK-----	44
Изоформа 4	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK-----	44
Изоформа 5	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQIPTEDGSEEPG	60
Изоформа 6	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDACLKESPLQIPTEDGSEEPG	60
Изоформа 1	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQIPTEDGSEEPG	60
Фетальный	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK-----	

Изоформа 2	SETSDAKSTPTAEDVTAAPLVDEGAPGKQAAAPHTTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Изоформа 3	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
Изоформа 4	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	62
Изоформа 5	SETSDAKSTP-----TAAEEAGIGDTPSLEDEAAG	91
Изоформа 6	SETSDAKSTPTAEDVTAAPLVDEGAPGKQAAAPHTTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Изоформа 1	SETSDAKSTPTAEDVTAAPLVDEGAPGKQAAAPHTTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG	120
Фетальный	-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG	

Изоформа 2	HVTQ-----	124
Изоформа 3	HVTQ-----	66
Изоформа 4	HVTQ-----	66
Изоформа 5	HVTQ-----	95
Изоформа 6	HVTQEPESGKVVQEGFLREPGPPGLSHQILMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSGTGPEDETEG	180
Изоформа 1	HVTQEPESGKVVQEGFLREPGPPGLSHQILMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSGTGPEDETEG	180
Фетальный	HVTQ-----	

Фиг. 6А

```

Изоформа 2 -----
Изоформа 3 -----
Изоформа 4 -----
Изоформа 5 -----
Изоформа 6 GRHAPPELLKHQLLGDHLRQEGFPLKGAGGKERPGSKKEVDEDRDVESSPQDSPPSKASPA 240
Изоформа 1 GRHAPRLLKHQLLGDHLRQEGFPLKGAGGKERPGSKKEVDEDRDVESSPQDSPPSKASPA 240
Фетальный

Изоформа 2 -----
Изоформа 3 -----
Изоформа 4 -----
Изоформа 5 -----
Изоформа 6 QDGRPPQTAAREATSIFGFPAGGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGSPVGRAKQDAPLE 300
Изоформа 1 QDGRPPQTAAREATSIFGFPAGGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGSPVGRAKQDAPLE 300
Фетальный

Изоформа 2 -----
Изоформа 3 -----
Изоформа 4 -----
Изоформа 5 -----
Изоформа 6 FTFHVEITPNVQKEQAHSEHHLGRAAFPAGPGEPEARGPSLGEDTKEADLPEPSEKQPA 360
Изоформа 1 FTFHVEITPNVQKEQAHSEHHLGRAAFPAGPGEPEARGPSLGEDTKEADLPEPSEKQPA 360
Фетальный
Изоформа 2 -----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK----- 143
Изоформа 3 -----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK----- 85
Изоформа 4 -----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK----- 85
Изоформа 5 -----ARMVSKSKDGTGSDDKKAK----- 114
Изоформа 6 AAPRGKPVSRVPQLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKSTRSSAKTLKNRPCLSPKHPTPGSS 420
Изоформа 1 AAPRGKPVSRVPQLKARMVSKSKDGTGSDDKKAKSTRSSAKTLKNRPCLSPKHPTPGSS 420
Фетальный
*****

```

Фиг. 6B

```

Изоформа 2 -----GADGKTKIATPRGAAPPQK 163
Изоформа 3 -----GADGKTKIATPRGAAPPQK 105
Изоформа 4 -----GADGKTKIATPRGAAPPQK 105
Изоформа 5 -----GADGKTKIATPRGAAPPQK 134
Изоформа 6 DPLIQPSSPAVCPEPPSSPKHVSSVTSRTGSSGAKEMKLGADGKTKIATPRGAAPPQK 480
Изоформа 1 DPLIQPSSPAVCPEPPSSPKHVSSVTSRTGSSGAKEMKLGADGKTKIATPRGAAPPQK 480
Фетальный
-----GADGKTKIATPRGAAPPQK
*****

Изоформа 2 GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT 205
Изоформа 3 GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT 147
Изоформа 4 GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT 147
Изоформа 5 GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT 176
Изоформа 6 GQANATRIPAKTTPAKTTPSSATKQVQRPPAGPERSERGEPPKSGDRSGYSSPGSPGT 540
Изоформа 1 GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT 522
Фетальный
GQANATRIPAKTTPAKTTPSS-----GEPKSGDRSGYSSPGSPGT
*****

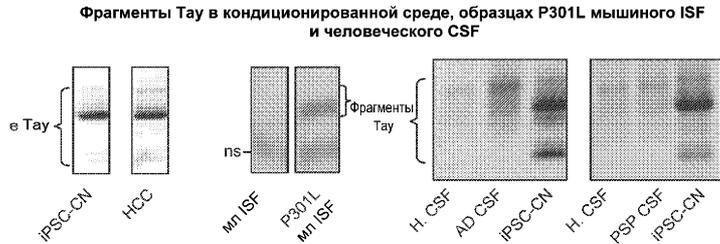
Изоформа 2 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 265
Изоформа 3 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 207
Изоформа 4 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 207
Изоформа 5 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 236
Изоформа 6 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 600
Изоформа 1 PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN 582
Фетальный
PGSRRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKIGSTEN
*****

```

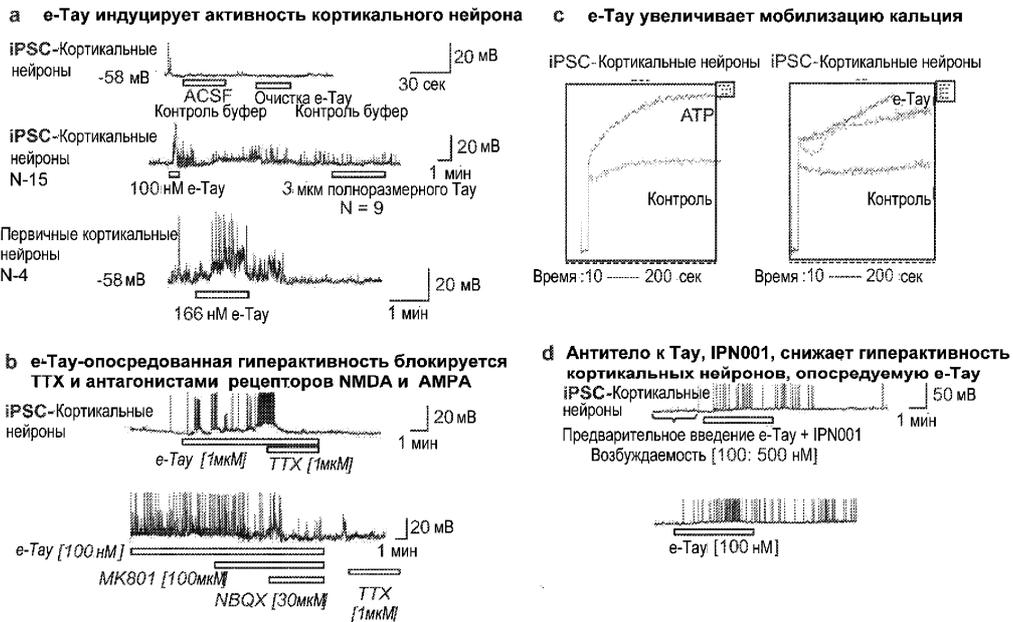
Фиг. 6C

Изоформа 2	LKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHV PGGGSVQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	325
Изоформа 3	LKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHV PGGGSVQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	267
Изоформа 4	LKHQPGGCK-----VQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	236
Изоформа 5	LKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHV PGGGSVQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	296
Изоформа 6	LKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHV PGGGSVQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	660
Изоформа 1	LKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDNI KHV PGGGSVQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL	642
Фетальный	LKHQPGGCK-----VQIVYKPVVDLSKVTSKCGSL *****	*****
Изоформа 2	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	385
Изоформа 3	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	327
Изоформа 4	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	296
Изоформа 5	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	356
Изоформа 6	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	720
Изоформа 1	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK	702
Фетальный	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGGNKKIETHKLTFFRENAKAK *****	*****
Изоформа 2	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	441 (SEQ ID NO:21)
Изоформа 3	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	383 (SEQ ID NO:22)
Изоформа 4	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	352 (SEQ ID NO:23)
Изоформа 5	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	412 (SEQ ID NO:24)
Изоформа 6	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	776 (SEQ ID NO:25)
Изоформа 1	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL	758 (SEQ ID NO:26)
Фетальный	TDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSTSGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:27) *****	*****

Фиг. 6D



Фиг. 7



Фиг. 8

IPN002 VH Вариант 1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTTCATCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTCGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
 E V H I L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCTTGGGTTTCGCCAGS⁰CCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTAGTAGTAGTGGGAGTCCGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
 40 50 52 A 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTCAAATTAGCTGG
 F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C S I S W
 70 80 82 A B C 90
 310 320 330 340 350
GACGGTGTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:28)
D G A M D Y W G Q G T S V T V S S (SEQ ID NO:36)
 100 110 113

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 9

IPN002 VH Вариант 2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTTCATCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTCGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
 E V H I L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCTTGGGTTTCGCCAGS⁰CCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTAGTAGTAGTGGGAGTCCGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P C K C L E W V A T I S S S C S R T Y Y P D S V K C R
 40 50 52 A 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTCAAATTAGCTGG
 F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
 70 80 82 A B C 90
 310 320 330 340 350
GACGGTGTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCCCGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:29)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:37)
 100 110 113

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
 CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 10

IPN002 VH ' Вариант 3

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGFTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
              10                          20                          30

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCCTGGGTTCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGTTCGCAACCATTAGTAGTAGTGGGAGTCGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
              40                          50 52 A                          60

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTGTCAATTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C S I S W
              70                          80 82 A B C                          90

      310     320     330     340     350
GACGGTGCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGGACCACCGTCCCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:30)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:38)
      100                          110      113

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 11

IPN002 VH ' Вариант 4

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGFTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTCAGTAAATATGGCA
E V Q L V E S G G A L V K P G G S L R L S C A A S G F S F S K Y G
              10                          20                          30

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCCTGGGTTCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGTTCGCAACCATTAGTAGTAGTGGGAGTCGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCAG
M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S S S G S R T Y Y P D S V K G R
              40                          50 52 A                          60

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCCATTAGCTGG
F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A M Y Y C A I S W
              70                          80 82 A B C                          90

      310     320     330     340     350
GACGGTGCCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGGACCACCGTCCCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:31)
D G A M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:39)
      100                          110      113

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 12

IPN002 Vk Вариант 1

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATGTTTGGATGACCCAAAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCCACCTTGGACAGCCCGCCTCCATCTCTTGCAAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V L M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10      20      27 A B C D E

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGCTCCACAGCTCCTGGCTTACAAAGTTTCCAAATCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTCGGATCAGCCACAGATTTCCACACTCAAGATCAGCCACACTGGAGGCTCAGCGATGTGGGAACCTTATTACTGCCTTTCAGGGCTCACTTCCTCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V P
70      80      90

310     320
TGGGCTTCCGCTGGAGGCCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:32)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:40)
100      106 A

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 13

IPN002 Vk Вариант 2

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATGTTTGGATGACCCAAAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCCACCTTGGACAGCCCGCCTCCATCTCTTGCAAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10      20      27 A B C D E

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGCTCCACAGCTCCTGGCTTACAAAGTTTCCAAATCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTCGGATCAGGGACAGATTTCCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTCAGGATGTGGGAACCTTATTACTGCCTTTCAGGGCTCACTTCCTCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G T Y Y C F Q G S L V P
70      80      90

310     320
TGGGCTTCCGCTGGAGGCCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:33)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:41)
100      106 A

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 14

IPN002 Vk Вариант 3

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATGTTGTGATGACCCAAAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCCACCCCTGGACAGCCCGCCCTCCATCTCTTGCAAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10      20      27 A B C D E

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCCTGGTCTACAAAGTTTCCAAATCGATTCTTGGGGTCCCAGACAGATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L V Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTGTATTACTGCTTTCAGGGCTCACTTGTTCCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S L V P
70      80      90

310     320
TGGGCGTTCCGTTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:34)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:42)
100      106 A

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 15

IPN002 Vk Вариант 4

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATGTTGTGATGACCCAAAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCCACCCCTGGACAGCCCGCCCTCCATCTCTTGCAAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S I V H S N
10      20      27 A B C D E

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCCTGGTCTACAAAGTTTCCAAATCGATTCTTGGGGTCCCAGACAGATT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTGTATTACTGCTTTCAGGGCTCACTTGTTCCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S L V P
70      80      90

310     320
TGGGCGTTCCGTTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:35)
W A F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:43)
100      106 A

```

Определение CDRs и нумерация белковых последовательностей по системе нумерации Kabat.
CDRs и нуклеотидные последовательности, кодирующие CDRs, выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Фиг. 16

Таблица 4: Связывание вариантов IPN002 с Тау-белками

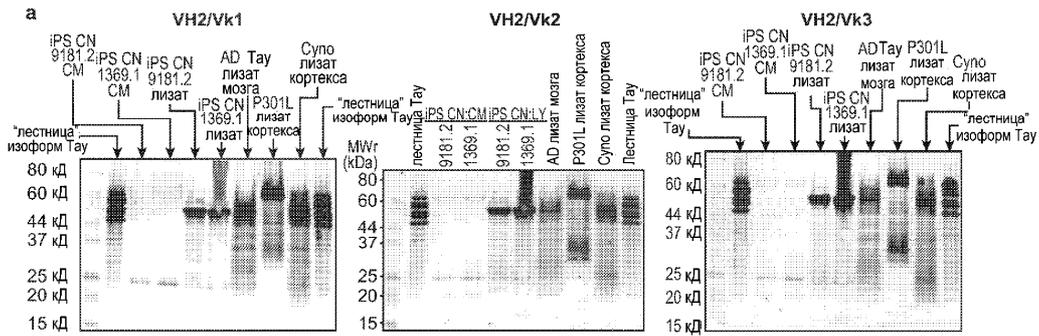
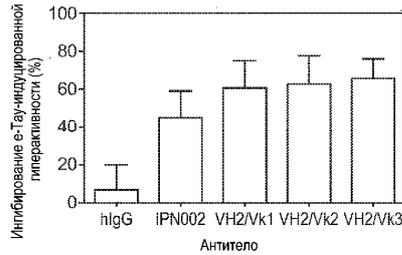
Антитело	K _D значения (M)					
	rTay383	e Tay 1a	e Tay 1b	eTay 2	e Tay4	e Tay 4
VH1/Vk1	1.83E-10	2.94E-10	7.37E-10	4.65E-10	3.58E-10	5.77E-10
VH1/Vk2	1.21E-10	2.12E-10	5.58E-10	3.61E-10	3.21E-10	6.33E-10
VH1/Vk3	1.75E-10	2.91E-10	5.90E-10	4.44E-10	4.78E-10	7.61E-10
VH1/Vk4	2.86E-10	2.52E-10	5.97E-10	4.27E-10	2.69E-10	8.69E-10
VH2/Vk1	2.42E-10	2.81E-10	2.15E-10	2.25E-10	3.69E-10	3.21E-10
VH2/Vk2	1.99E-10	3.27E-10	2.29E-10	2.83E-10	2.94E-10	3.94E-10
VH2/Vk3	2.23E-10	3.27E-10	2.87E-10	2.61E-10	2.19E-10	4.11E-10
VH2/Vk4	2.48E-10	3.43E-10	5.20E-10	3.54E-10	4.18E-10	6.71E-10
VH3/Vk1	2.36E-10	2.41E-10	5.29E-10	7.05E-10	4.54E-10	9.21E-10
VH3/Vk2	2.58E-10	2.82E-10	6.14E-10	4.08E-10	5.89E-10	7.01E-10
VH3/Vk3	2.24E-10	2.20E-10	6.89E-10	4.71E-10	4.69E-10	6.65E-10
VH3/Vk4	2.55E-10	2.16E-10	3.82E-10	4.47E-10	3.81E-10	5.86E-10
VH4/Vk1	1.87E-10	1.98E-10	3.59E-10	4.05E-10	2.80E-10	4.98E-10
VH4/Vk2	1.60E-10	1.91E-10	4.83E-10	4.51E-10	2.91E-10	4.67E-10
VH4/Vk3	2.76E-10	1.78E-10	3.13E-10	4.73E-10	6.36E-10	6.29E-10
VH4/Vk4	3.79E-10	3.25E-10	5.35E-10	5.64E-10	4.62E-10	1.03E-09

Фиг. 17

Таблица 5: Связывание вариантов гуманизированного IPN002 с Тау383

Антитело	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
VH1/VK1	4.26E-11	2.06E+05	8.75E-06
VH1/VK2	4.46E-10	1.96E+05	8.74E-05
VH1/VK3	1.28E-09	1.82E+05	2.33E-04
VH1/VK4	5.71E-10	1.67E+05	9.52E-05
VH2/VK1	4.67E-10	2.14E+05	1.00E-05
VH2/VK2	2.32E-10	2.05E+05	4.75E-05
VH2/VK3	1.73E-09	1.34E+05	2.32E-04
VH2/VK4	1.66E-09	1.42E+05	2.36E-04
VH3/VK1	1.99E-09	1.29E+05	2.57E-04
VH3/VK2	5.77E-10	1.85E+05	1.07E-04
VH3/VK3	1.69E-10	1.87E+05	3.15E-05
VH3/VK4	4.75E-10	2.11E+05	1.00E-04
VH4/VK1	2.12E-09	1.40E+05	2.97E-04
VH4/VK2	1.88E-09	1.63E+05	3.07E-04
VH4/VK3	5.71E-10	1.64E+05	9.39E-05
VH4/VK4	8.12E-10	1.56E+05	1.26E-04
IPN002	2.06E-10	2.33E+05	4.78E-05

Фиг. 18

**b** Антитела ингибируют е-Тау-индуцированную гиперактивность

Фиг. 19

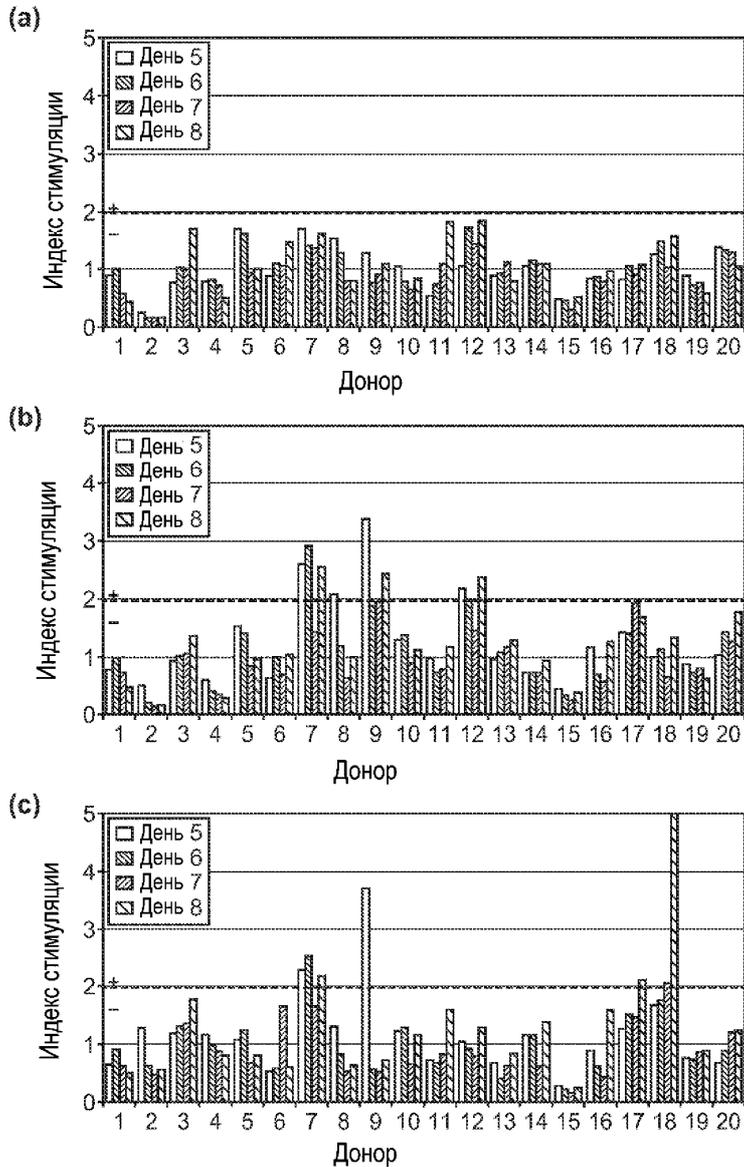
фетальный MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
 #2 AEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
 #3 AEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
 #4 AEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
 e-Тау 2-172 AEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA
 e-Тау 2-176 AEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTEAGLKAEEAGIGDTPSLEDEA

фетальный AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPA
 #2 AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPA
 #3 AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPA
 #4 AGHVTQAR (68) (SEQ ID NO:48)
 e-Тау 2-172 AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPA
 e-Тау 2-176 AGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPA

фетальный FKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTFGSRRTFSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSA
 #2 FKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTFGSR (151) (SEQ ID NO:46)
 #3 PK (122) (SEQ ID NO:47)
 e-Тау 2-172 FKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTFGSRRTFSLPTPTREPKKVAVVR (SEQ ID NO:44)
 e-Тау 2-176 FKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTFGSRRTFSLPTPTREPKKVAVVRTPPK (SEQ ID NO:45)

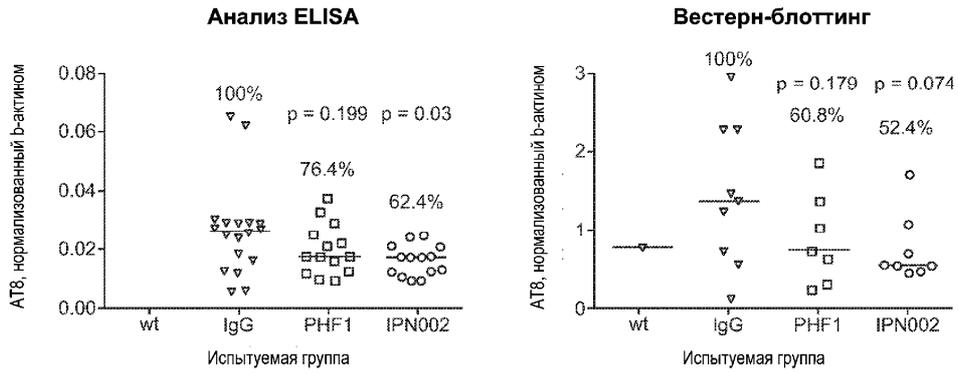
фетальный K SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQFGGKQVIVYKPVDLKSVTSKCGSLGNIHNK
 фетальный PGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI THVPGGNGK IETHKLTFRENAKAKTDHCAEI
 фетальный VYKSPVVSGDTPRHLSNVSSSTGSDMVDSPLATLADEVASASLAKQGL (SEQ ID NO:27)

Фиг. 20

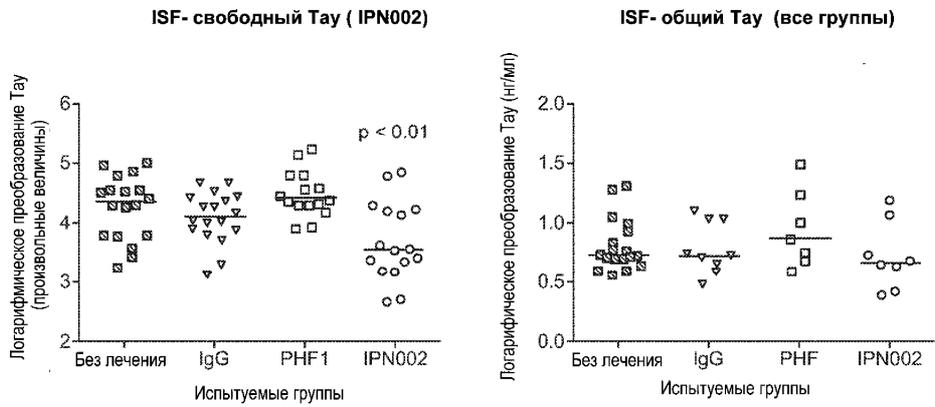


Фиг. 21

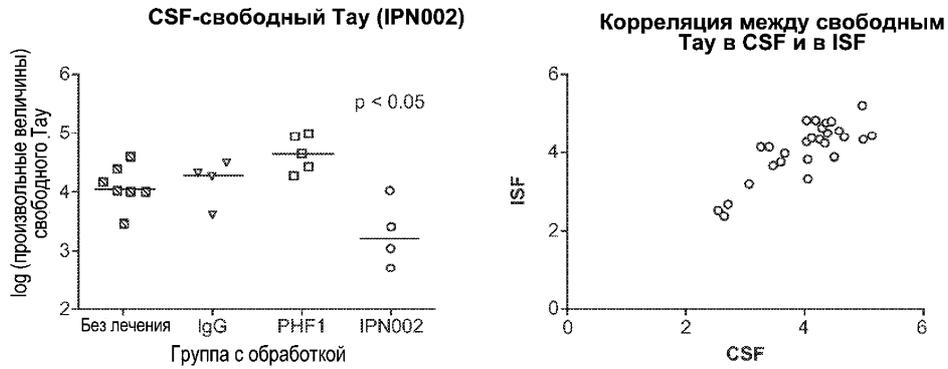
Солюбилизированный детергентом рТau (AT8)



Фиг. 22

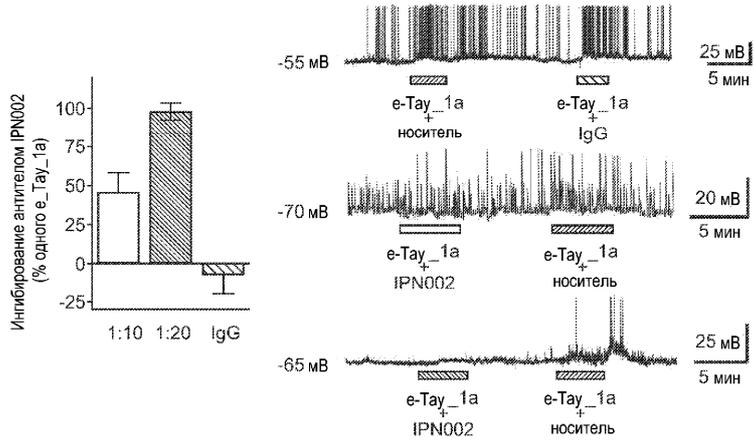


Фиг. 23



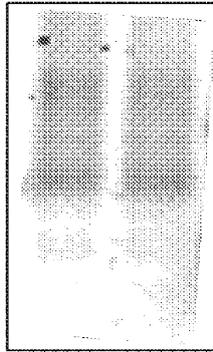
Число пар XY	27
Коэффициент корреляции Г-Пирсона	0.8094
Доверительный интервал	0.6200 to 0.9096
Значение P (двухсторонний тест)	< 0.0001
Суммарное значение P	***
Является ли корреляция значительной? (альфа=0.05)	Да
R-квадрат	0.6551

Фиг. 24



Фиг. 25

WB e-Tau



H CTE

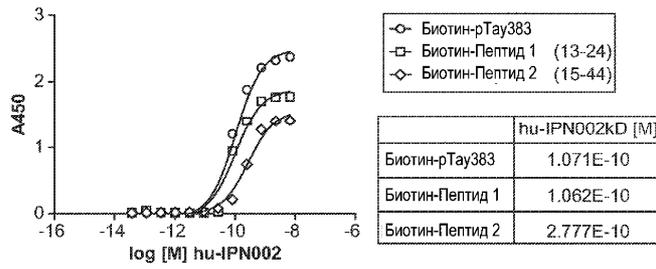
Фиг. 26

Синтезированные Тау-пептиды:

Пептид 1: Биотин-ahx-¹³DHAGTYGLGDRK²⁶ (SEQ ID NO: 49)

Пептид 2: Биотин-ahx-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK⁴⁴ (SEQ ID NO: 50)

Твёрдофазный метод- Тау-пептиды с hu-IPN002

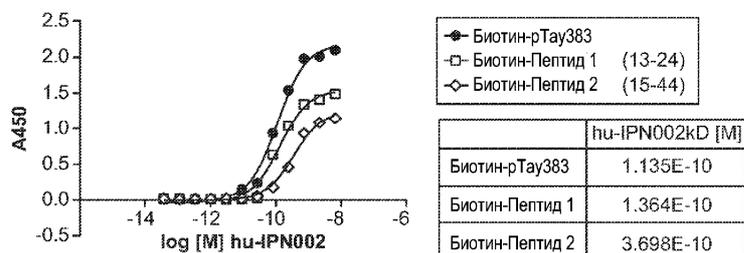


Фиг. 27

Синтезированные Тау-пептиды:

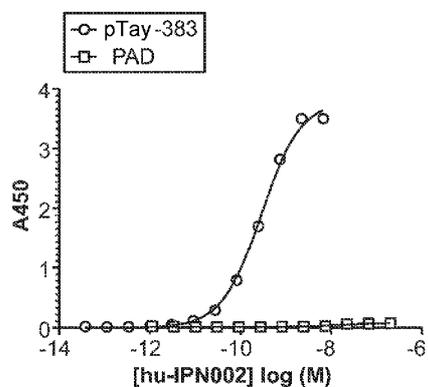
Пептид 1: Биотин -ahx-¹³DHAGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 49)Пептид 2: Биотин -ahx-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTBAGLK⁴⁴ (SEQ ID NO: 50)

Жидкофазный метод - Тау-пептиды с hu-IPN002



Фиг. 28

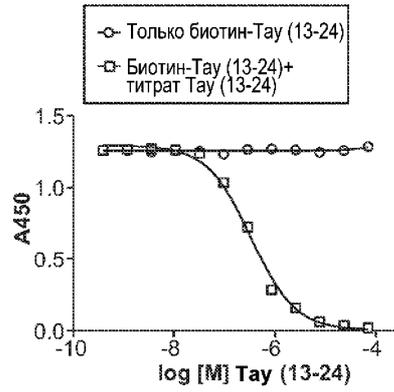
Анализ связывания с hu-IPN002



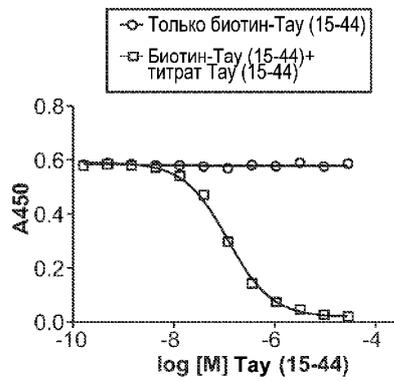
	Hu-IPN002k _D [M]
pTau383	2.88E-10
PAD	н.о.

Фиг. 29

Биотин-Тау (13-24) и Тау (13-24) конкурируют за связывание с hu-IPN002

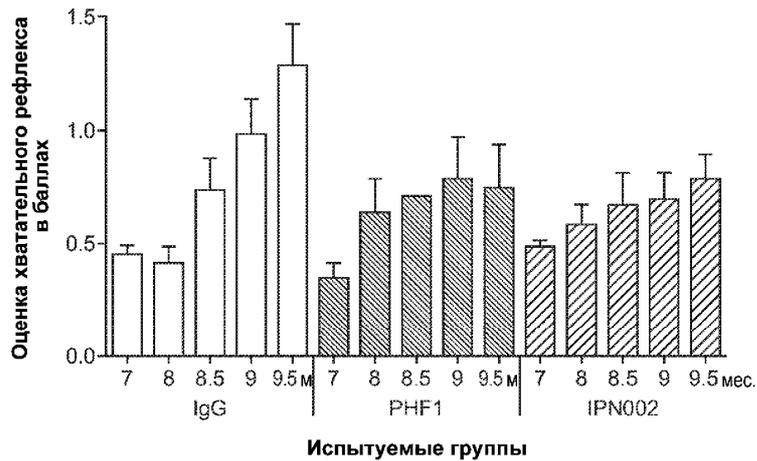


Биотин-Тау (15-44) и Тау (53-44) конкурируют за связывание с hu-IPN002



Фиг. 30

Оценка хватательного рефлекса в баллах



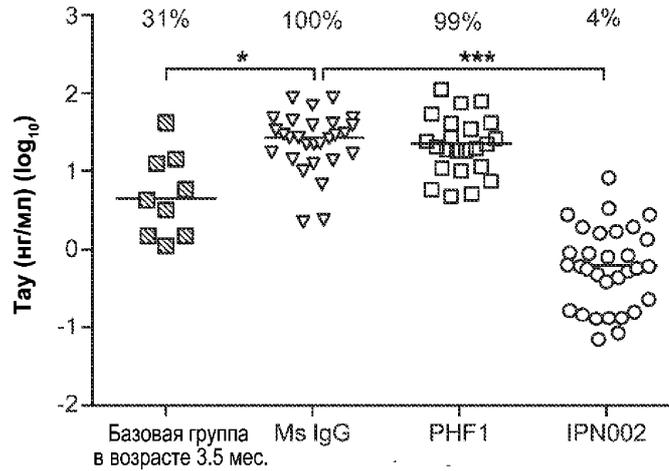
Значение p для IgG по сравнению с IPN002 приближается к статистической значимости (p= 0.056)

Фиг. 31



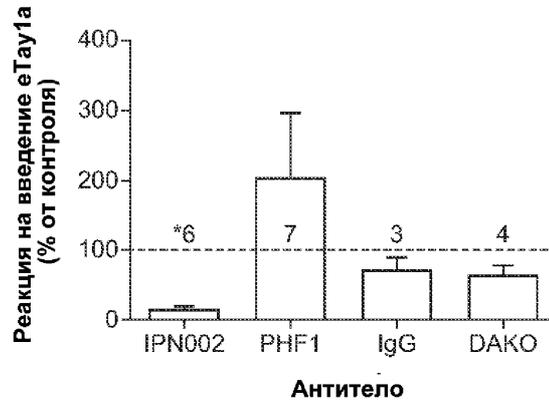
Фиг. 32

Уровень свободного Тау (Тау, не связанного с IPN002) в образцах CSF от мышей P301L



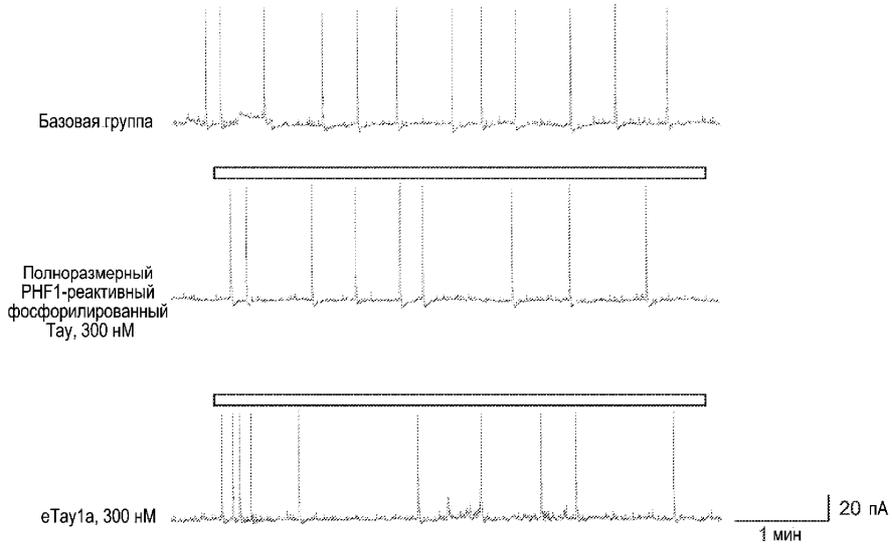
Фиг. 33

Ингибирование реакции на введение eTau1a

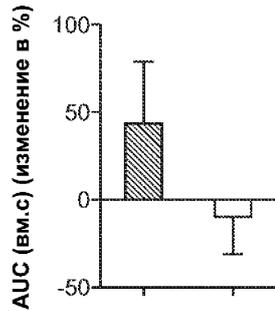


Цифры на графике показывают количество нейронов, испытанных для каждого антитела

Фиг. 34

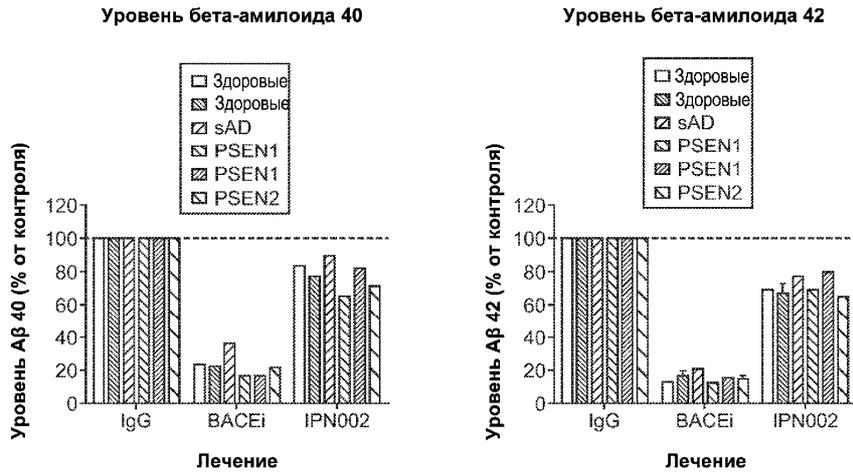


Фиг. 35



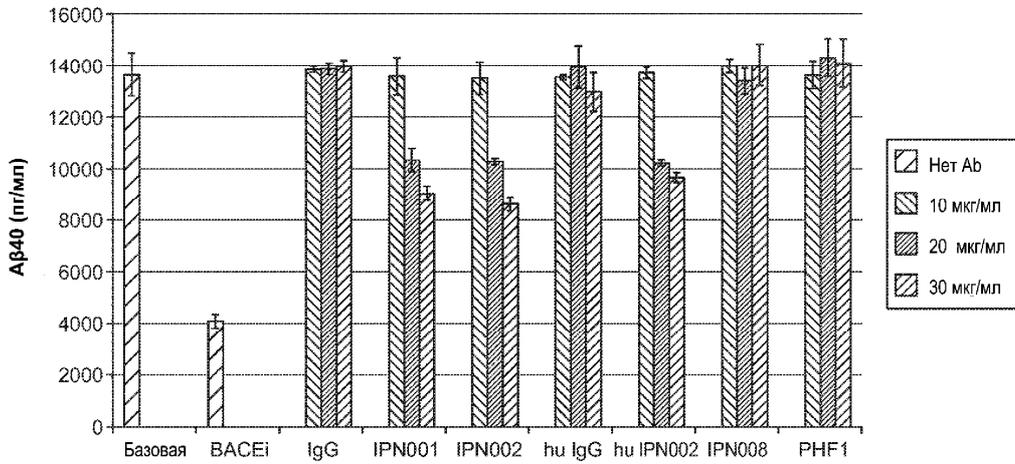
N=3

Фиг. 36



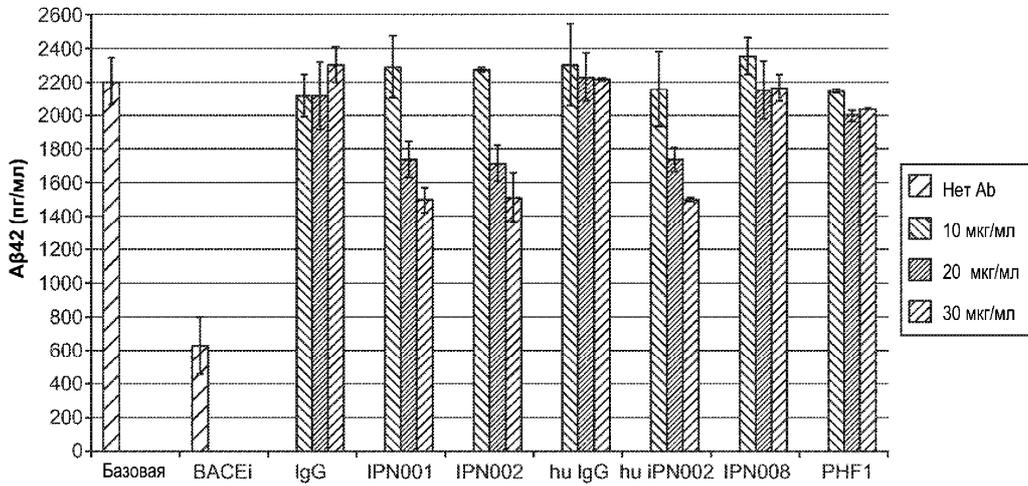
Фиг. 37

Аβ40, секретируемый первичными кортикальными нейронами, через 40 дн. лечения, данные ELISA



Фиг. 38

Аβ42, секретируемый первичными кортикальными нейронами, через 40 дн. лечения, данные ELISA



Фиг. 39

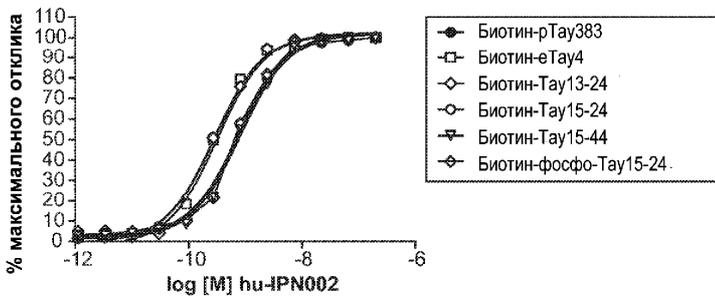
Биотин -ahx-¹³DHAGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 49)

Биотин -ahx-¹⁵AGTYGLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 51)

Биотин -ahx-¹⁵AGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK⁴⁴ (SEQ ID NO: 50)

Биотин -ahx-¹⁵AGTY (phospho) GLGDRK²⁴ (SEQ ID NO: 52)

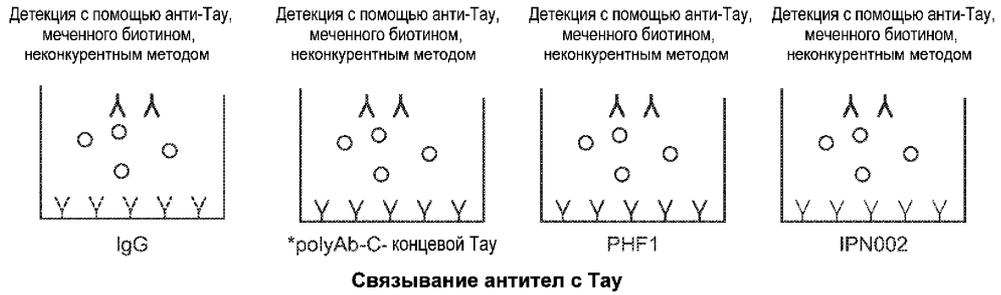
**Анализ связывания Тау-полипептидов с hu-IPN002
% от максимального отклика**



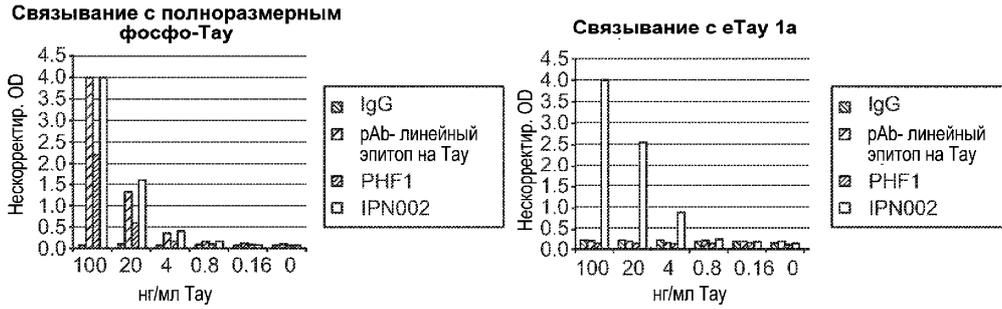
Образец	K_D [M]
Биотин-рТау383	2.83E-10
Биотин-еТау4	2.89E-10
Биотин-Тау13-24	3.18E-10
Биотин-Тау15-24	7.54E-10
Биотин-Тау15-44	8.13E-10
Биотин-Тау15-24 ФОСФО	7.68E-10

Фиг. 40

Анализ связывания антитела с Тау в CSF

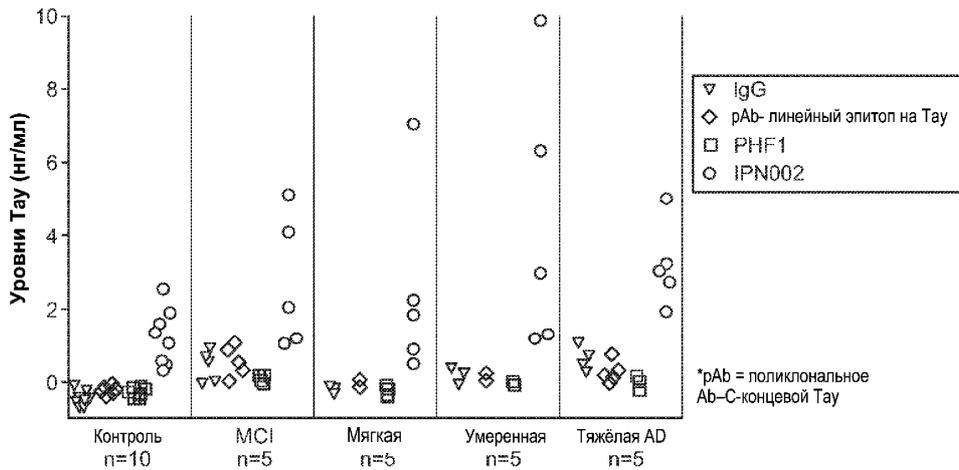


Связывание антител с Тау



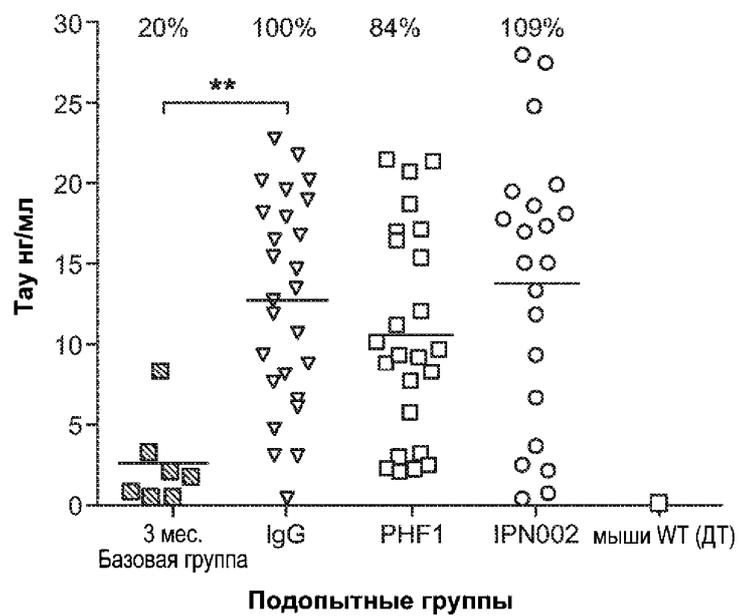
Фиг. 41

Тау в CSF связывается с IPN002, но не с Тау pAb, ни с PHF1



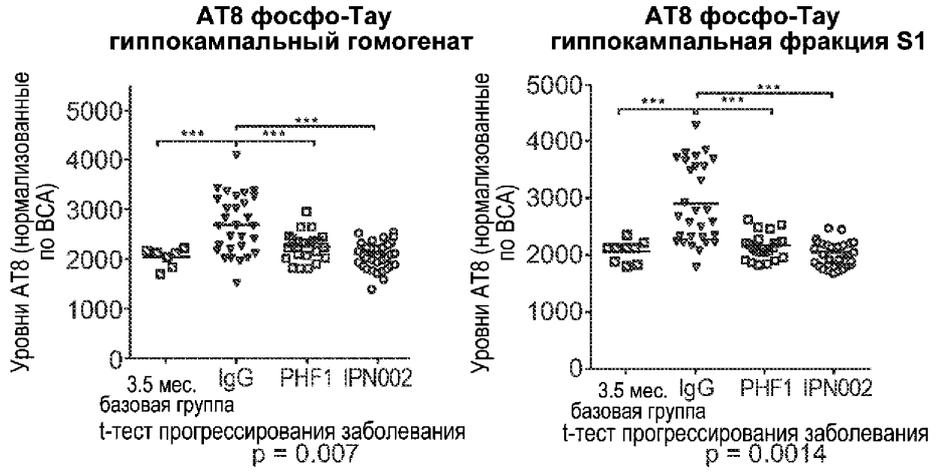
Фиг. 42

Уровни тотального Тау в образцах CSF



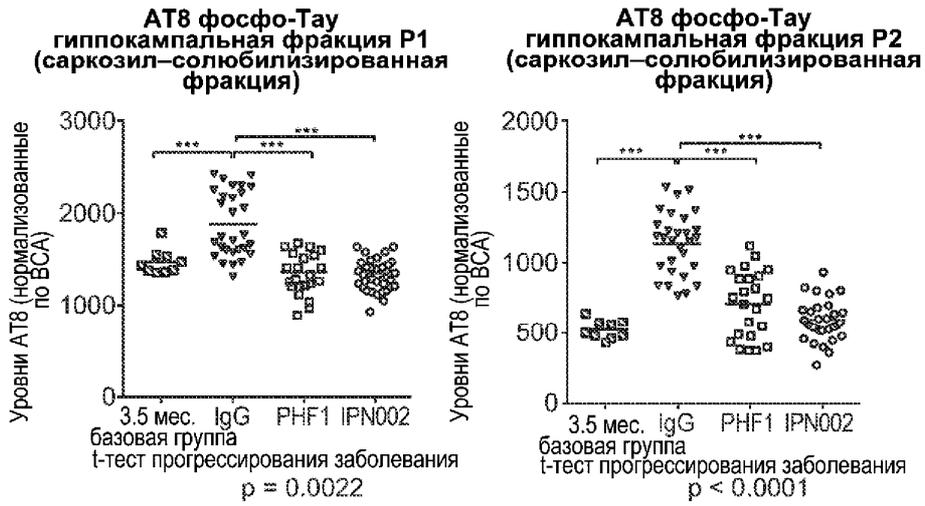
Фиг. 43

*p < 0.05
 **p < 0.01
 ***p < 0.001
 ****p < 0.0001



A

B

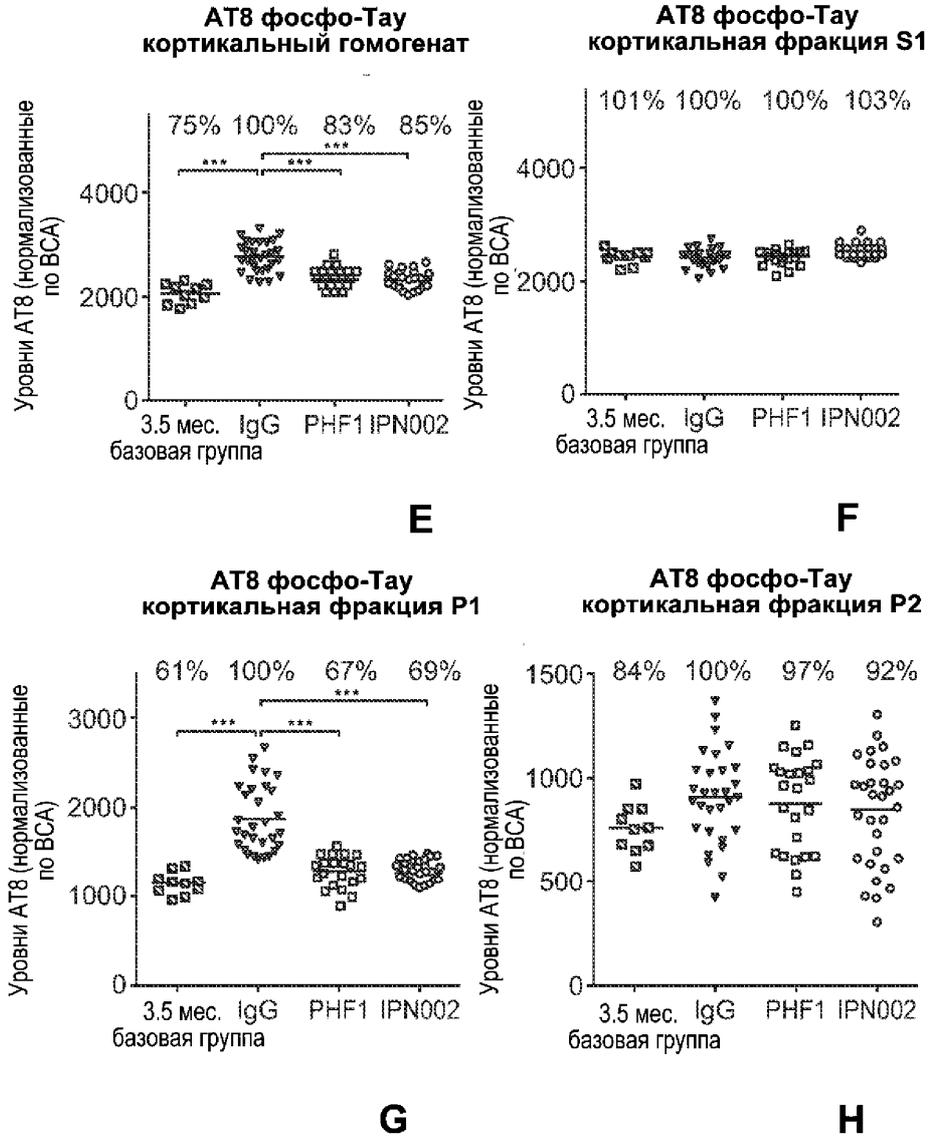


C

D

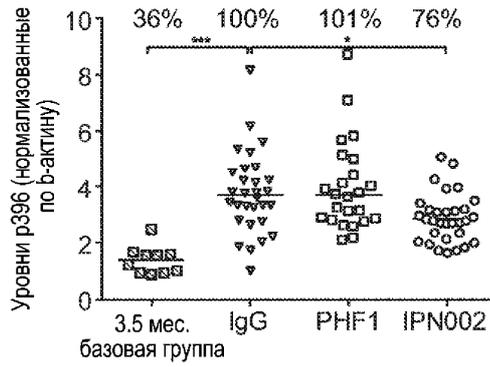
Однофакторный ANOVA с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений

*=p<.05
 **=p<.01
 ***=p<.001



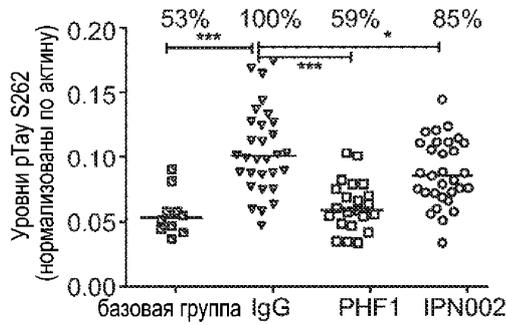
Фиг. 44

**Человеческий p396-Tau
Человеческий p396-Tau в S1 коры**



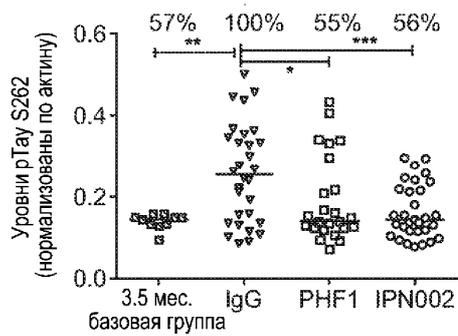
Подопытные группы
t-тест (Стьюдента) прогрессирования заболевания $p = 0.0001$
Фиг. 45А

**pTau S262 в тотальном гомогенате коры
(нормализованный по актину)**



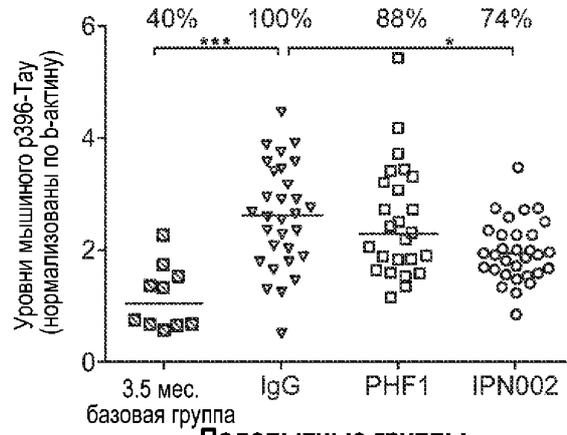
Подопытные группы
Фиг. 45В

pTau S262 во фракции S1 коры (нормализован по актину)



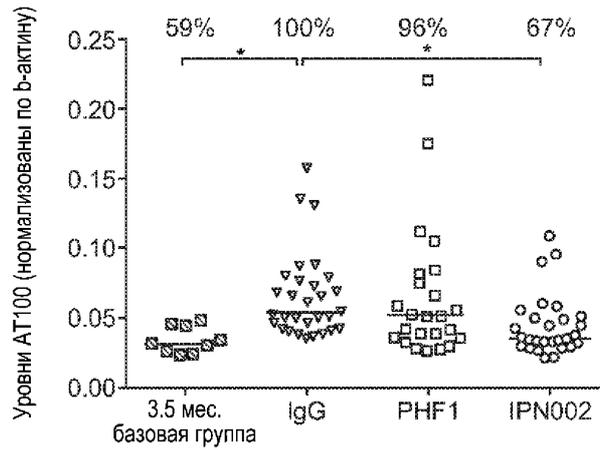
Подопытные группы
Фиг. 45С

Мышиный р396-Tau
Мышиный р396-Tau в S1 коры



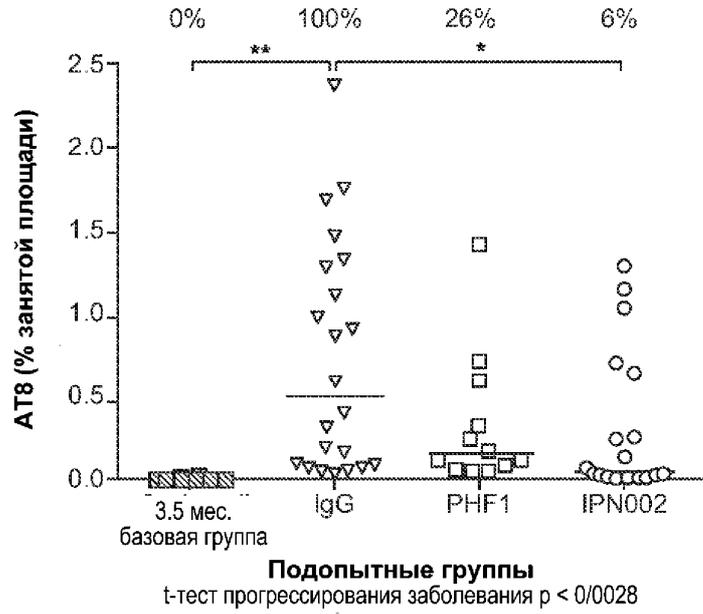
Фиг. 45D

Мышиный AT100 в S1 коры



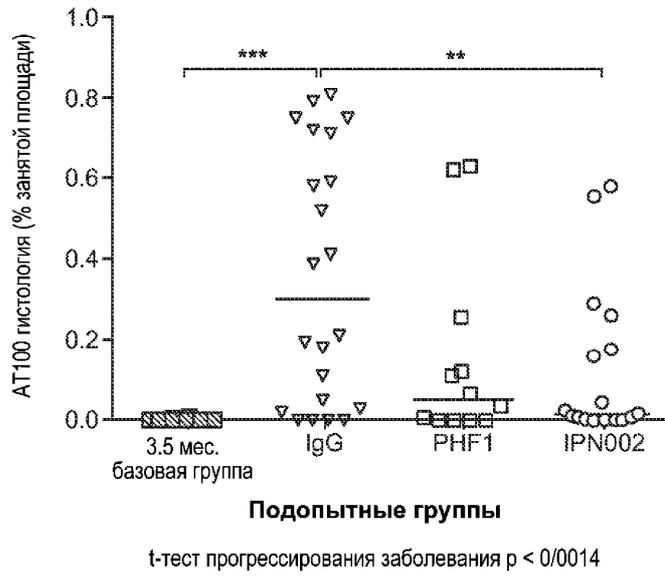
Фиг. 45E

AT8 в заднем мозге, гистология-STH-позднее умерщвление



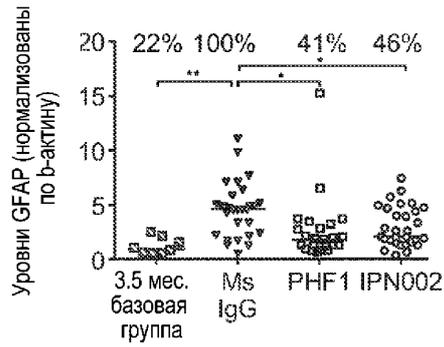
Фиг. 46

AT100 в заднем мозге, гистология-LATINTAP-позднее умерщвление



Фиг. 47

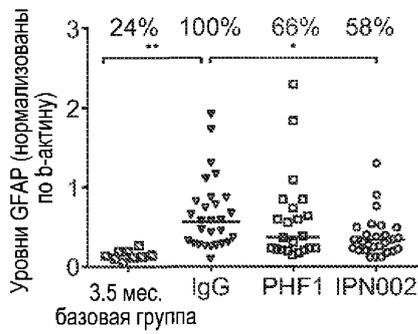
Уровни GFAP в гиппокампальном гомогенате



Подопытные группы

Фиг. 48А

Гомогенат коры-GFAP

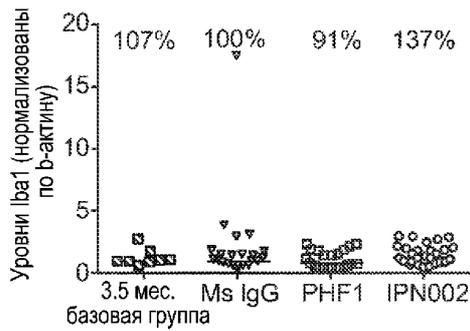


Подопытные группы

t-тест прогрессирования заболевания $p = 0.0019$

Фиг. 48В

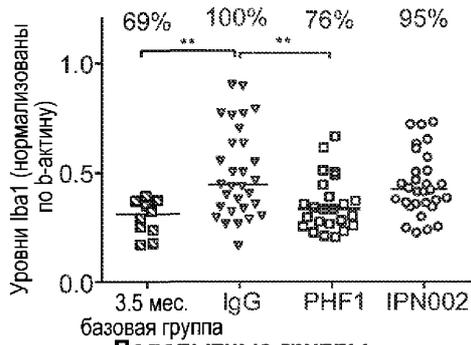
Уровни Iba1 в гиппокампальном гомогенате



Подопытные группы

Фиг. 49А

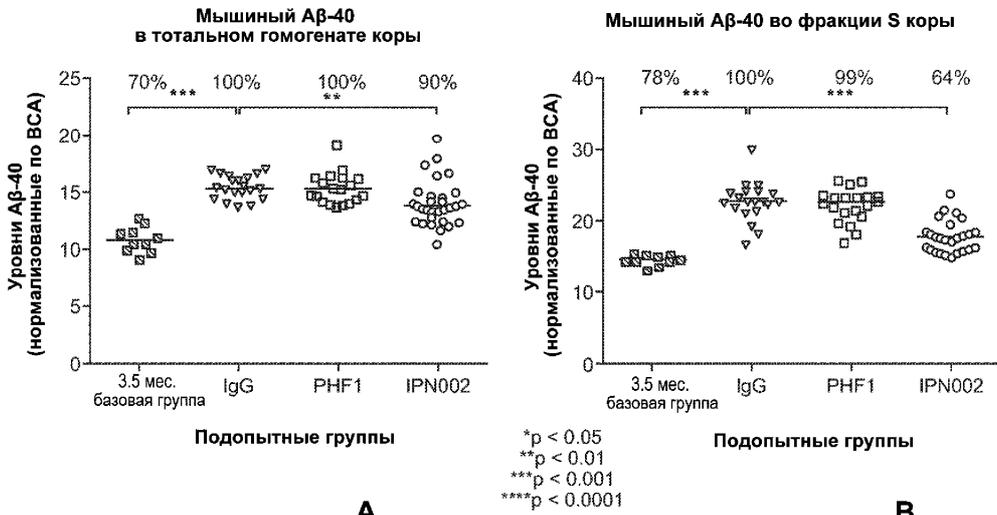
Iba1 в тотальном гомогенате коры



Подопытные группы

t-тест прогрессирования
заболевания $p = 0.0041$

Фиг. 49В

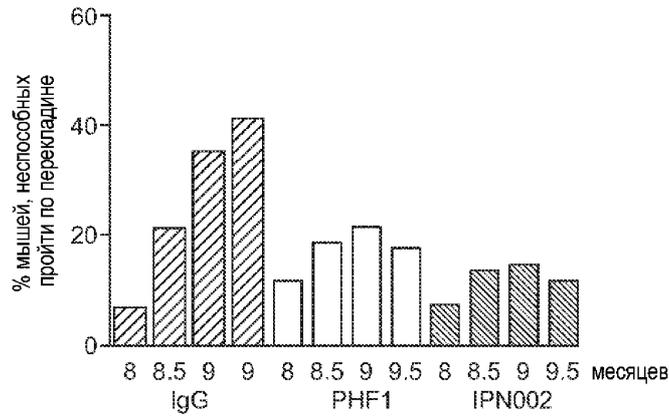


A

B

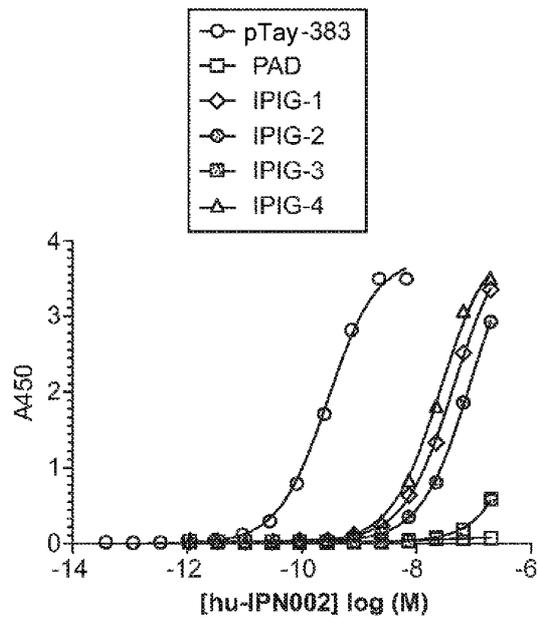
Фиг. 50

**Процент мышей, неспособных пройти тест
"прогулка по приподнятой перекладине"**



Фиг. 51

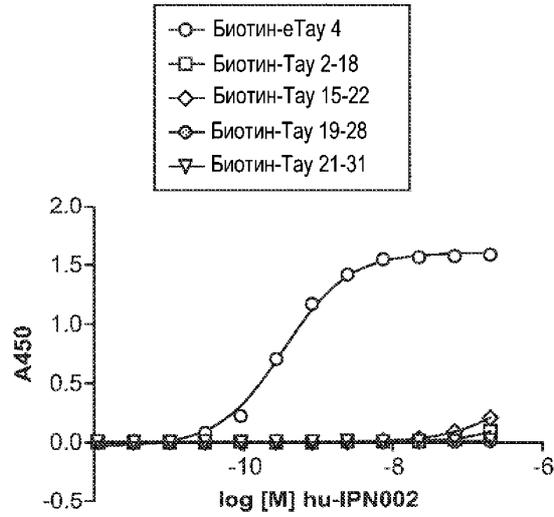
Анализ связывания с hu-IPN002



	hu-IPN002 K_D [M]
pTay-383	2.88E-10
PAD (2-18)	n.a.
IPIG-1 (9-24)	4.52E-08
IPIG-2 (13-24)	9.03E-08
IPIG-3 (15-22)	n.a.
IPIG-4 (15-44)	2.65E-08

Фиг. 52

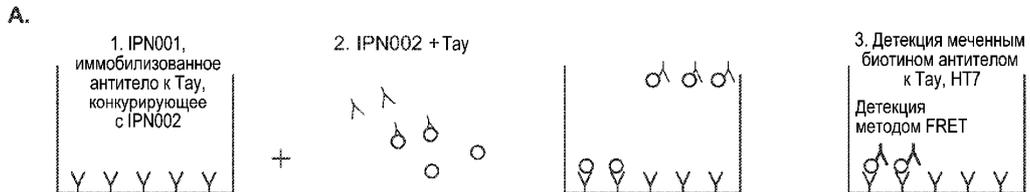
Анализ связывания Тау пептидов с hu-IPN002



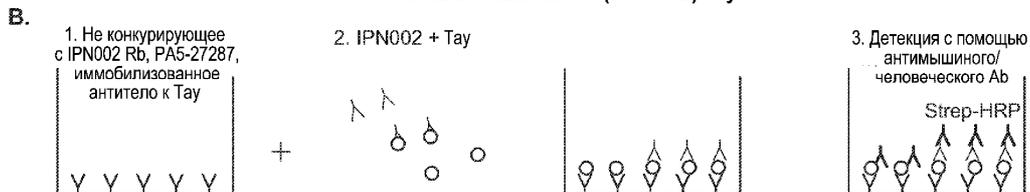
Образец	K_D [M]
Бiotин-еТau 4	$3.447E-10$
Бiotин-Тau 2-18	п.а.
Бiotин-Тau 15-22	неполный
Бiotин-Тau 19-28	п.а.
Бiotин-Тau 21-31	п.а.

Фиг. 53

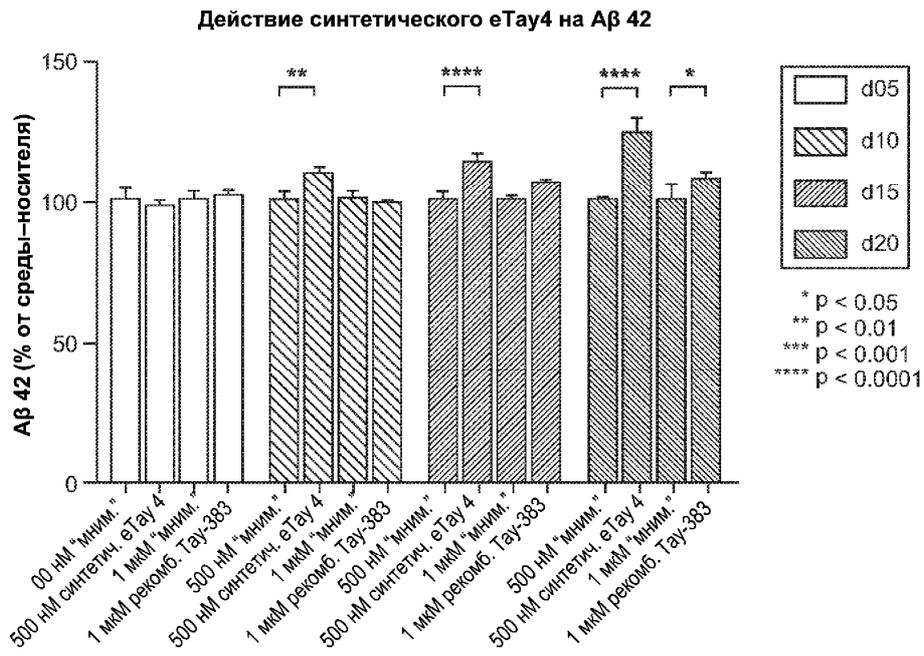
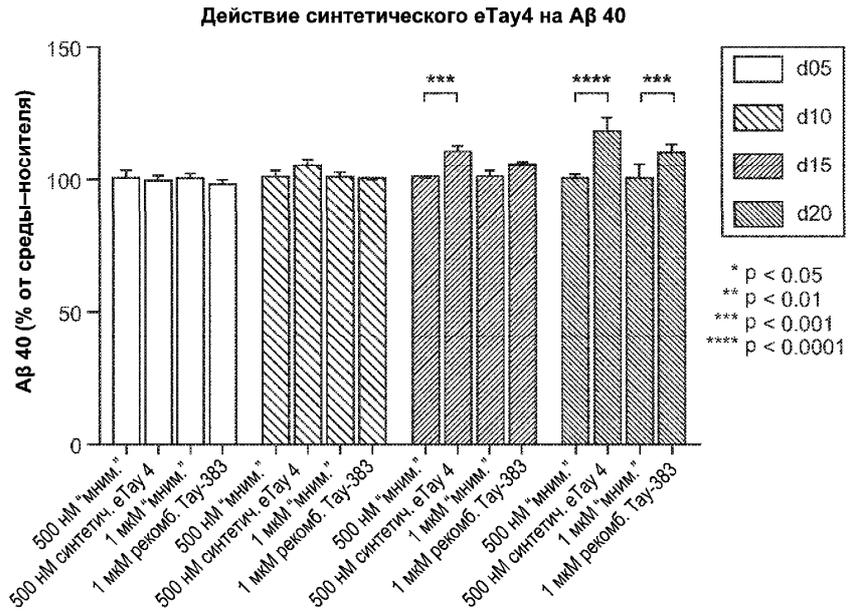
Анализ свободного (от IPN002) Тау

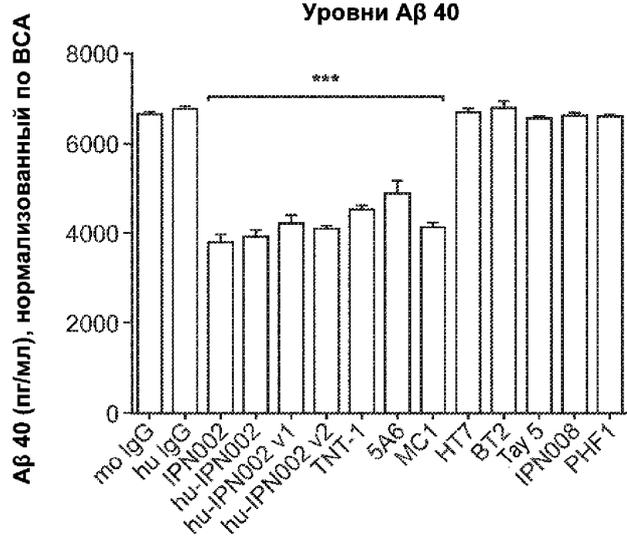


Анализ связанного (с IPN002) Тау



Фиг. 54

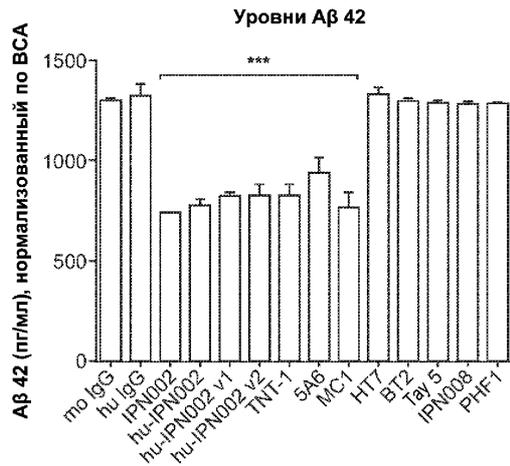




n=3 для каждого состояния
Данные на 20й день обработки, 30 мкг/мл [антитело]

*** p<0.0001
 Tay Ab vs. IgG

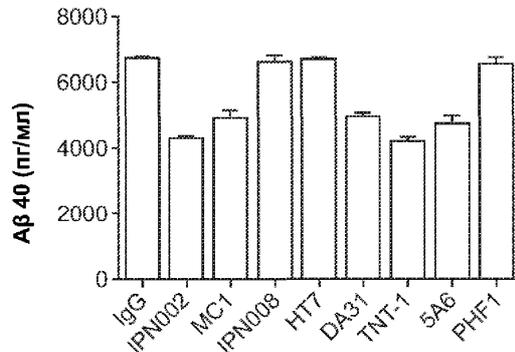
Фиг. 56А



n=3 для каждого состояния
Данные на 20й день обработки, 30 мкг/мл [антитело]

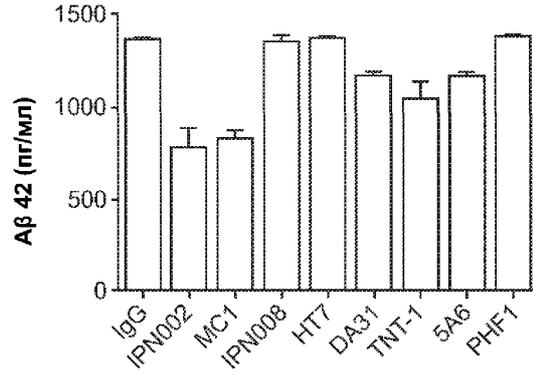
*** p<0.0001
 Tay Ab vs. IgG

Фиг. 56В



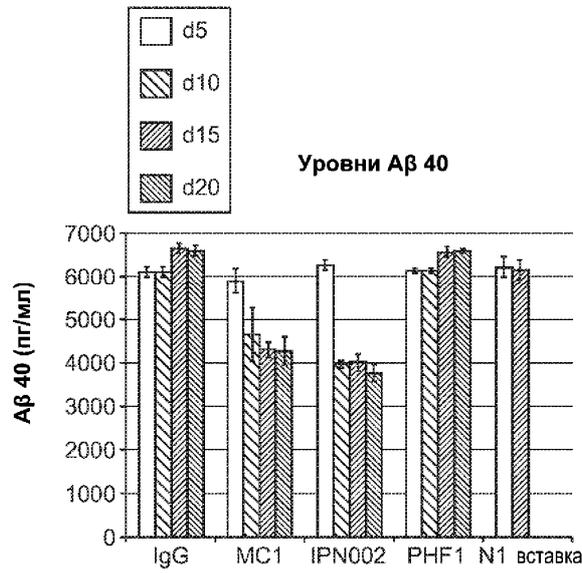
Показаны данные на 20й день обработки,
30 мкг/мл

Фиг. 57А

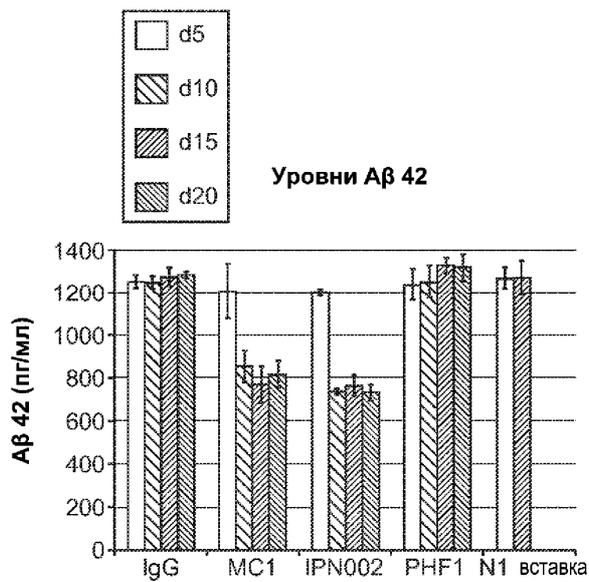


Показаны данные на 20й день обработки, 30мкг/мл

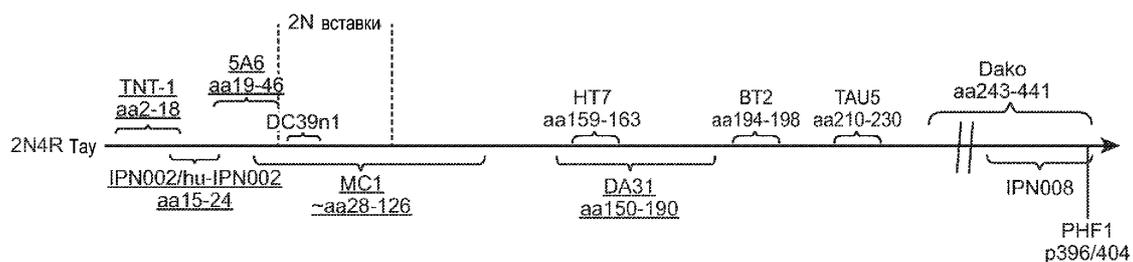
Фиг. 57В



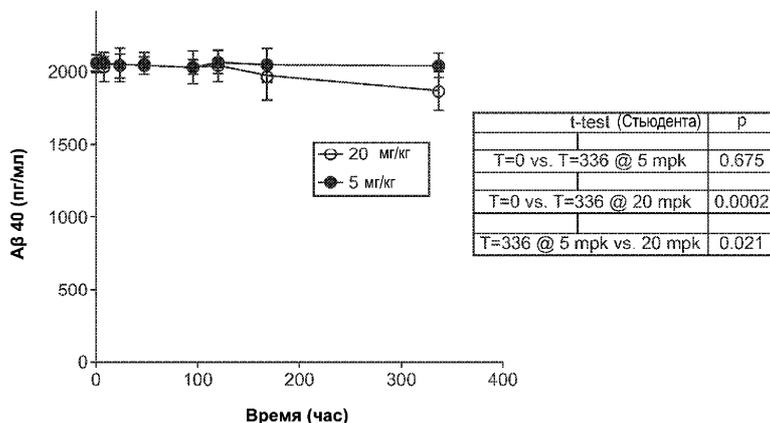
Фиг. 58А



Фиг. 58В



Фиг. 59



Фиг. 60

```

eTay 4 AEPRQEFEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK----- 43
2N4R MAEPRQEFEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQPTTEDGSEEPG 60

eTay 4 -----AEEAGIGDTPSLEDEAAG 61
2N4R SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG 120

eTay 4 HVTQAR 67
2N4R HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQGANATRTPAKTPPPAPK 180

2N4R TFPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTFGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVTRFPKSPSSAK 240

2N4R SRLQTAPVMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV 300

2N4R PGGGSVQIVYKPVDLKSVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDPKDRVQSKIGSLDNI 360

2N4R THVPGGGNKKIETHKLTFRENA KAKTDHGCAEIVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSSITGSIDMV 420

2N4R DSPQLATLADEV SASLAKQGL 441
    
```

Фиг. 61

