



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.11

(21) Номер заявки
201892570

(22) Дата подачи заявки
2017.07.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАННОМУ ТАУ-БЕЛКУ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PA201600416; PA201700005;
PA201700008; PA201700179
(32) 2016.07.12; 2017.01.04; 2017.01.04;
2017.03.14

(33) DK

(43) 2019.07.31

(86) PCT/EP2017/067067

(87) WO 2018/011073 2018.01.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Х. ЛУНДБЕКК А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Педерсен Ян Торлейф, Кьяергаард
Кристиан, Педерсен Ларс Остергаард,
Асуни Айодеджи Абдур-Рашид,
Розенквист Нина Хелен, Дэчсел
Юстус Клаус Альфред, Джухл
Карстен, Тагмос Лена, Мариго Мауро,
Йенсен Томас, Кристенсен Сорен,
Давид Лаурент, Фольбрахт Кристиан,
Хельбо Лоун (DK)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) Anonymous: "Mouse anti-Phospho-Tau 396 Mouse anti-Phospho-Tau 396; Catalog No. 35-5300", invitrogen catalogue Catalog No. 35-5300, 1 October 2008 (2008-10-01), XP055308498, Retrieved from the Internet: URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/35-5300_Mouse_anti-Phospho-Tau_396_Rev_1008.pdf [retrieved on 2016-10-07], the whole document

Anonymous: "Product datasheet Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731] ab109390", abcam product catalogue, 1 January 2014 (2014-01-01), XP055308426, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.abcam.com/Tau-phospho->

S396-antibody-EPR2731-ab109390.pdf [retrieved on 2016-10-06], the whole document

WO-A2-2012045882

WO-A1-2013050567

JOËLLE ROSSELS ET AL.: "Tau Monoclonal Antibody Generation Based on Humanized Yeast Models", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 7, 24 December 2014 (2014-12-24), pages 4059-4074, XP055250974, US ISSN: 0021-9258, DOI:10.1074/jbc.M114.627919, table 3

DAVID SINGER ET AL.: "Characterization of Phosphorylation Dependent Antibodies To Study the Phosphorylation Status of the Tau Protein", INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH AND THERAPEUTICS; FORMERLY KNOWN AS LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 11, no. 4, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 279-289, XP019287635, ISSN: 1573-3904, abstract

MICHAEL A. BRISTER ET AL.: "OGlcNAcylation and Phosphorylation Have Opposing Structural Effects in tau:Phosphothreonine Induces Particular Conformational Order", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 136, no. 10, 12 March 2014 (2014-03-12), pages 3803-3816, XP055308062, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja407156m, abstract

Anonymous: "Tau Phosphorylation Site-Specific Antibody Sampler (Containing Tau pS199, pT205, pT231, pS262, pS356, pS396, pS404, pS409, pS422 Rabbit Polyclonal & Tau [TAU-5] Monoclonal Antibodies, Unconjugated) PRODUCT ANALYSIS SHEET", In: "Tau Phosphorylation Site-Specific Antibody Sampler (Containing Tau pS199, pT205, pT231, pS262, pS356, pS396, pS404, pS409, pS422 Rabbit Polyclonal & Tau [TAU-5], Monoclonal Antibodies, Unconjugated) PRODUCT ANALYSIS SHEET", 1 January 2010 (2010-01-01), invitrogen, XP055342248, the whole document

WO-A2-2017009308

(57) Изобретение относится к классу моноклональных антител, которые специфически связываются с фосфорилированным сериновым остатком 396 в патологическом гиперфосфорилированном (PHF) тау-белке (pS396) с улучшенной аффинностью, а также к способам применения этих молекул и их фрагментов, связывающих тау-белок, в лечении болезни Альцгеймера и других таупатий.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новому классу моноклональных антител, которые специфически связываются с фосфорилированным сериновым остатком 396 в патологическом гиперфосфорилированном (PHF) тау-белке (pS396), а также к способам применения этих молекул и их фрагментов, связывающих тау-белок, в лечении болезни Альцгеймера и таупатий.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R 1.821 и далее, которые раскрыты на машиночитаемых носителях (название файла: 1049-WO-PCT_FINAL_ST25_1.txt, создан 13 июня 2017 г. и имеет размер 65 кБ), при этом данный файл включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Возрастные нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD) и деменция, в настоящее время являются одной из крупнейших общественных проблем. По оценкам Всемирной организации здравоохранения стоимость лечения лиц старшего возраста будет продолжать повышаться, и количество диагностированных случаев деменции утроится к 2050 г. (World Health Organization and Alzheimer's Disease International - Status Report (2012) DEMENTIA: A public health priority, WHO). Первыми средствами лечения AD были модуляторы высвобождения нейромедиаторов, такие как ингибиторы ацетилхолинэстеразы, и модуляторы NMDA-рецепторов. Эти терапевтические средства стали доступными на рубеже тысячелетий и по-прежнему образуют краеугольный камень облегчения симптомов дефицитов памяти, связанных с деменцией и AD. Тем не менее, эти лекарственные средства не воздействуют целенаправленно на первопричины AD: накопление агрегатов β -амилоидного (β) пептида и тау-белка и ассоциированную с ним утрату нейронных синапсов и в конечном счете нейронов.

Долгосрочные исследования в широком общественном масштабе с участием лиц старшего возраста (Weiner M.W. et al. (2014) ADNI online: <http://www.adni-info.org/>; Breteler, M.M. et al. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 23-28; Launer, L.J. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 2-13) наряду с масштабными полногеномными исследованиями ассоциаций (Lambert, J.C. et al. (2013) Nat. Genet. 45, 1452-1458) показали, что AD представляет собой неоднородную комбинацию форм деменции, где до 10 процентов пациентов с запущенной формой AD не имеют патологии амилоидного пептида (Crary, J.F. et al. (2014) Acta Neuropathol. 128, 755-766). Дополнительно, фундаментальные патологоанатомические исследования, проведенные Braak и Braak (Braak H. and Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12), продемонстрировали четкую корреляцию между степенью патологии нейрофибриллярных клубков и когнитивным статусом перед вскрытием. Эти наблюдения подкреплялись несколькими исследователями (Nelson, P.T. et al. (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381) и в недавних долгосрочных исследованиях биомаркеров, которые указывают на то, что уровни тау-белка и гиперфосфорилированного тау-белка в спинномозговой жидкости (CSF) повышаются на протяжении ранних и поздних стадий заболевания (Jack, C.R., Jr. et al. (2013) Lancet Neurol. 12, 207-216).

Как указано выше, тау-белок, ассоциированный с микротрубочками, и его гиперфосфорилированный вариант образуют основную составляющую внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, которые являются одним из главных характерных признаков AD. Дополнительно, определенные варианты гена тау-белка ассоциированы с семейными формами лобно-височной деменции (FTD). Появление патологии тау-белка при AD происходит в соответствии с четко выраженным пространственным паттерном, начиная с энторинальной коры с последующим переходом в гиппокампальные и корковые зоны (Braak, H. and Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12). Конкретная стадия патологии тау-белка также хорошо коррелирует с когнитивными способностями (Nelson, P.T. et al. (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381; Braak, E. et al. (1999) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 249 Suppl 3, 14-22). Взятые вместе эти данные составляют основу гипотезы, опирающейся на то, что тау-белок играет определенную роль в AD. Она подразумевает, что внутриклеточное накопление тау-белка приводит к разрушению микротрубочек и коллапсу дендритных шипиков. В результате этого нарушается коммуникация между нейронами и наступает гибель клеток. Недавно также было показано, что тау-белок сам по себе может образовывать эндопатогенные молекулы, которые могут способствовать распространению нейродегенерации от одной клетки к следующей (Clavaguera, F. et al. (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913).

I. Тау-белок в качестве эндопатогена

Clavaguera и соавторы продемонстрировали, что тау-белок сам по себе может действовать в качестве эндопатогена (Clavaguera F. et al. (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913). Экстракты головного мозга, получаемые при низкой скорости центрифугирования, выделяли из трансгенных по тау-белку мышей P301S (Allen, B. et al. (2002) J. Neurosci. 22, 9340-9351), разбавляли и инъецировали в гиппокамп и корковые зоны молодых мышей ALZ17. Мыши ALZ17 представляют собой трансгенную по тау-белку линию мышей, у которых развивается только поздняя форма патологии (Probst, A. et al. (2000) Acta Neuropathol. 99, 469-481). У подвергнутых инъекции мышей ALZ17 быстро развивалась патология плотных филаментов, и введение иммуноистощенных по тау-белку экстрактов головного мозга от мышей P301S или экстрактов от мышей дикого типа не индуцировало патологию тау-белка. Фракционирование экстрактов головного мозга на растворимый (S1) и нерастворимый (P3) тау-белок (Sahara, N. et al. (2013) J.

Alzheimer's. Dis. 33, 249-263) и их инъекция мышам ALZ17 продемонстрировали, что фракция P3 в наибольшей степени способна индуцировать патологию. Она содержит большую часть внутриклеточного гиперфосфорилированного филаментозного тау-белка. Патологию в большинстве случаев также можно было индуцировать при инъекции экстрактов от P301S в головной мозг мышей дикого типа, но NFT не образовывались. В последующих исследованиях Clavaguera и соавт. показали, что человеческий тау-белок, экстрагированный посмертно из ткани головного мозга с другими таупатиями (болезнью аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующим надъядерным параличом (PSP) и кортикобазальной дегенерацией (CBD)), также может индуцировать патологию тау-белка в модели ALZ17 (Clavaguera, F. et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 9535-9540). С момента представления этих данных сообщалось о некоторых других моделях затравочного действия и разнесения тау-белка (Ahmed, Z. et al. (2014) Acta Neuropathol. 127, 667-683; Walker, L.C. et al. (2013) JAMA Neurol. 70, 304-310). Основным выводом этих исследований указывает на механизм, посредством которого патогенный тау-белок во внутриклеточных включениях секретируется из клетки в периплазматическое пространство. Патологический материал тау-белка затем транспортируется по оболочке синаптических пузырьков как в anterogradном, так и в retrogradном направлении и впоследствии поглощается соседними клетками путем объемного эндоцитоза. Этот механизм объясняет, почему разнесение патологии, наблюдаемое при заболевании у человека, следует четко выраженному анатомическому паттерну. Весьма любопытно, что периферическое введение патологического тау-белка может ускорять формирование патологии тау-белка у мышей ALZ17 (Clavaguera, F. et al. (2014) Acta Neuropathol. 127, 299-301). Этот механизм разнесения может объяснять распространение заболевания при других протеинопатиях (Goedert M. et al. (2010) Trends Neurosci. 33, 317-325; Sigurdsson, E.M. et al. (2002) Trends Mol. Med. 8, 411-413).

II. Молекулы тау-белка

Обнаружение того, что тау-белок может действовать в качестве эндопатогена, побудило к поиску "патогенных молекул", на которые можно нацеливаться в рамках потенциальных методов интервенционной терапии.

Ген тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ), расположен на хромосоме 17 в человеческом геноме и экспрессирует шесть изоформ тау-белка в головном мозге взрослого человека. Эти изоформы образуются в результате альтернативного сплайсинга экзонов 2, 3 и 10 из 16 экзонов в гене МАРТ. Экзоны 2 и 3 экспрессируют повтор из 29 аминокислот, а экзон 10 экспрессирует дополнительный домен, связывающийся с микротрубочками. В результате этого изоформы тау-белка будут содержать 0, 1 или 2 N-концевых повтора и 3 или 4 C-концевых домена, связывающихся с микротрубочками (тау-белок 3R или 4R). Обычно экспрессируются шесть изоформ тау-белка. Наиболее длинная (2N4R) и наиболее короткая (0N3R) изоформы состоят из 441 и 352 аминокислот соответственно (Kolarova, M. et al. (2012) Int. J. Alzheimers. Dis. 2012, 731526). N-концевой выступающий домен тау-белка (2N4R) состоит из "хвоста" с высоким содержанием глицина из 44 аминокислот и остатков 45-102, охватывающих две высококислые области (N1, N2-домены). В остатках 151-243 обнаружены две области, богатые пролином (P1, P2-домены). Остальную часть белка составляют четыре домена, связывающихся с микротрубочками (R1-R4), за которыми расположена короткая C-концевая область.

Тау-белок является растворимым и высоколабильным в отношении фосфорилирования белком. Примерно 20% или 85 аминокислотных остатков в наиболее длинной изоформе тау-белка являются потенциальными (Ser, Thr или Tyr) сайтами фосфорилирования. Экспериментально наблюдалось, что примерно половина из них фосфорилируется (Hanger, D.P. et al. (2009) Trends Mol. Med. 15, 112-119; Hasegawa, M. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 17047-17054) и что сайты фосфорилирования группируются вокруг концевых остатков доменов, связывающихся с микротрубочками. Тау-белок подвергается динамичному фосфорилированию и дефосфорилированию в ходе клеточного цикла. Он должен диссоциировать из микротрубочек, чтобы обеспечить прохождение митоза. Его основной ролью в постмитотических клетках (дифференцированных нейронах) является действие в качестве стабилизатора микротрубочек, что обеспечивает оптимальный аксональный транспорт. Он может ассоциировать с микротрубочками только в своей главным образом дефосфорилированной форме, поэтому фосфорилирование выступает в качестве непосредственного переключателя ассоциации с микротрубочками/диссоциации из микротрубочек в нейроне. В нормальных условиях цитозольный тау-белок в среднем содержит два фосфорилированных сайта. В материале парных спиральных филаментов по меньшей мере 7-8 сайтов являются фосфорилированными (Hanger D.P. et al. (2009) Trends Mol. Med. 15, 112-119; Hasegawa M. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 17047-17054). Парные спиральные филаменты гиперфосфорилированного тау-белка являются ключевой характерной особенностью болезни Альцгеймера (Kosik et. al. (1986) PNAS, 86, 4044-4048), в иммуноцитохимическом анализе материала головного мозга человека с AD наблюдается четко выраженный сдвиг подвижности гиперфосфорилированного тау-белка.

Исследование тау-белка с помощью традиционных структурных методик, таких как рентгеновская кристаллография или спектроскопия ЯМР, было затруднительным, что отражает его метастабильную природу. Такие исследования проводились главным образом в отношении фрагментов доменов нефосфорилированного тау-белка. Единственное до настоящего времени структурное исследование полноразмерного тау-белка (2N4R) с помощью спектроскопии ЯМР выявило, что белок содержит только редкие

фрагменты стабильной вторичной структуры (Mukrasch M.D. et al. (2009) PLoS. Biol. 7, e34). Этот анализ указывает на то, что вторичная структура пептидного остова обладает высокой склонностью принимать структуру α -листа. Первые 200 остатков остова являются значительно более упорядоченными, чем С-конец, охватывающий домены, связывающиеся с микротрубочками. Наличие большого количества специфических взаимодействий дальнего порядка в белке в растворе указывает на то, что он существует в сильно разупорядоченном состоянии расплавленной глобулы (Ohgushi, M. and Wada, A. (1983) FEBS Lett. 164, 21-24).

В материале клубков были идентифицированы продукты расщепления тау-белка протеазами, образующиеся, в частности, под действием каспазы и кальпаина (Asp13, Glu391 и Asp421) (Gambelin T.C. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 10032-10037). В частности, усечение по Asp421 подробно изучалось с применением антитела C3 к тау-белку, которое связывается со свободным концом Asp421. Было предположено, что это усечение является ранним событием в патогенезе AD, ассоциированным с индукцией апоптоза (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201-1204). N-концевое расщепление по Asp13 и С-концевое расщепление по Glu391 считаются поздними событиями в патогенезе (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201-1204; Delobel, P. et al. (2008) Am. J. Pathol. 172, 123-131). Недавно в CSF от пациентов с AD и PSP был идентифицирован дополнительный N-концевой фрагмент (остатки 1-224), и была выдвинута гипотеза, что он является ранним маркером заболевания и особенно патогенным (US14/092539; Bright, J. et al. (2014) Neurobiol. Ageing, 1-17). Об аналогичном фрагменте, образующемся в результате расщепления кальпаином, сообщали другие группы (Ferreira A. and Bigio, E.H. (2011) Mol. Med. 17, 676-685; Reinecke, J.B. et al. (2011) PLoS. One. 6, e23865).

Было выдвинуто предположение, что, помимо гиперфосфорилирования и фрагментации тау-белка, посттрансляционное ацетилирование (Cohen T.J. et al. (2011) Nat. Commun. 2, 252; Min, S.W. et al. (2010) Neuron 67, 953-966) и O-GlcNAc-илирование (Zhu Y. et al. (2014) J. Biol. Chem.) являются процессами, определяющими патологию, при формировании патологии клубков, ассоциированной с AD.

III. Виды иммунотерапии с применением тау-белка

Виды иммунотерапии традиционно разделяются на пассивные и активные подходы к вакцинации. При активном подходе к вакцинации патогенное средство или его инактивированную патогенную форму вводят пациенту путем инъекции, и иммунная система вызывает иммунный ответ. Это запускает созревание В-клеток, вырабатывающих высокоаффинные антитела к введенному антигену или клеточный ответ к таковому. При пассивном подходе к вакцинации запуск иммунной системы избегают путем инфузии антитела, специфичного к антигену. Собственная система очищения организма затем удаляет связанный с антителом лиганд.

АС Immune предоставляет моноклональное мышинное антитело к фосфосерину-409 тау-белка. Определяли профиль антител к антигенам ткани головного мозга человека с AD и контрольной ткани головного мозга, и их отбирали на основании их способности к распознаванию патологии клубков. Оба гуманизированных варианта двух антител hACI-36-2B6-Ab1 и hACI-36-3A8-Ab1 связываются с эпитопом тау-белка в пределах аминокислот 401-418 (WO 2013/151762).

Группа Roger Nitsch выделила аутоантитела к тау-белку от пожилых здоровых индивидуумов без признаков дегенеративной таупатии. Был выделен ряд антител с применением полноразмерного рекомбинантного человеческого тау-белка (2N4R) для обнаружения антител, специфичных к тау-белку. Их потом подвергали скринингу в отношении их способности к проведению различий между изолятами тау-белка от больных и здоровых индивидуумов. Три лидерных антитела 4E4, 4A3 и 24B2 были описаны в патентной литературе (WO 2012049570; US 2012087861). Картирование их эпитопов указывает на то, что все они распознают аминокислоты в пределах области связывания с микротрубочками и в С-концевом направлении от него в положениях от V339 до K369. Эти антитела не проявляют какую-либо фосфоспецифичность.

C2N Diagnostics фокусируется главным образом на разработке средств диагностики для раннего выявления нейродегенеративного заболевания. Получали антитела к полноразмерному человеческому и мышинному тау-белку. Идентифицировали восемь и пять антител, соответственно распознающих человеческий и мышинный тау-белок (Yanamandra, K. et al. (2013) Neuron 80, 402-414). Три антитела с разными показателями кинетики связывания отбирали для оценивания *in vivo*. А именно это были HJ9.3, HJ9.4 и HJ8.5, распознающие соответственно остатки 306-320, 7-13 и 25-30 тау-белка, при этом последнее (HJ8.5) является специфичным к человеческому тау-белку. Антитела также отбирали на основании их способности к предупреждению переноса патологии в оригинальном механизированном репортерном анализе трансцеллюлярного распространения патологии тау-белка (Sanders, D.W. et al. (2014) Neuron 82, 1271-1288; Kfoury, N. et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 19440-19451). Их оценивание в исследованиях с длительной *i.c.v.* инъекцией у трансгенных по P301S мышей продемонстрировало их способность к уменьшению уровней гиперфосфорилированного тау-белка, определенную в иммуногистохимическом анализе обработанных мышей.

Антитела Peter Davies изначально разрабатывали как средства диагностики, которые могут обеспечивать установление различий между патологическим и нормальным тау-белком в материале головного мозга от субъектов с AD и контрольным материале головного мозга (Greenberg, S.G. and Davies, P. (1990)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5827-5831). Оценивание терапевтической полезности антител PHF1 и MC1 было продемонстрировано у мышей P301S и JPNL3 (P301L) (Boutajangout, A. et al. (2011) J. Neurochem. 118, 658-667; Chai, X. et al. (2011) J. Biol. Chem. 286, 34457-34467; D'Abramo C. et al. (2013) PLoS. One. 8, e62402). PHF1 распознает линейный эпитоп фосфорилированного тау-белка (pS396, pS404), тогда как MC1 представляет собой конформационно-зависимое антитело, которое распознает структурный эпитоп тау-белка, для которого требуются две отдельные части линейной последовательности, эпитоп в пределах остатков 46-202 и С-концевой эпитоп в пределах остатков 312-342 (Jicha G.A. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 48, 128-132). Инъекция этих двух антител в исследованиях с длительной 12-13-недельной иммунизацией приводила к существенному уменьшению патологии спинного мозга и ствола головного мозга среди других областей головного мозга, что преобразовывалось в ослабление двигательного дефицита, наблюдаемого у этих мышей. (D'Abramo C. et al. (2013) PLoS. One. 8, e62402).

iPerian/Bristol Meyers Squibb разработали антитела к тау-белку, направленные на предполагаемые патологические молекулы тау-белка, состоящие из N-концевого фрагмента тау-белка (eTau: остатки 1-224), которые способствовали гиперактивности в культурах нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Был разработан портфель антител, но получение характеристик было сфокусировано на антителах IPN001 и IPN002, которые распознают N-концевой эпитоп в пределах остатков 9-18. Соответственно, эти антитела выявляют повышенные уровни тау-белка в CSF от пациентов с установленной стадией AD и PSP, которые могут являться ранним признаком заболевания. Инъекции антител мышам JPNL3 (P301L) *in vivo* приводили к частичному устранению прогрессирующих двигательных дефицитов (US 14/092539).

Einar Sigurdsson сообщил о первой программе, демонстрирующей эффективность иммунотерапии на основе применения тау-белка. Для иммунизации мышей JPNL3 (P301L) применяли активную вакцину, состоящую из пептида тау-белка 379-408 [pS396, pS404] вместе с адъювантом Adju-Phos. В этом исследовании наблюдали выраженное уменьшение патологии тау-белка у мышей, обработанных вакциной, по сравнению с контрольными животными. Также выявляли ослабление двигательного фенотипа, связанного с таупатией. Его эффективность подтверждали в другой мышинной модели (htau/PS1), функционирующей без воздействия мутантного тау-белка (Boutajangout A. et al. (2011) AAIC 2011 (7, issue 4, Supplement edn) p. s480-s431; Congdon E.E. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 35452-35465; Gu J. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 33081-33095).

В Prothena оценили три антитела к тау-белку у трансгенных по тау-белку мышей K369I (K3) и в мышинной модели P301L. Антитела с различными свойствами отбирали для оценивания *in vivo*. Два pS404-специфичных антитела с разными изотипами (IgG1/k и IgG2a/k) или общее (панспецифическое) антитело к тау-белку (IgG1/k) инъецировали в рамках парадигмы длительного исследования. Мышей K369I обрабатывали посредством еженедельных инъекций в течение 21 недели, начиная с возраста 3 недель, а мышей P301L обрабатывали в течение 7 месяцев посредством еженедельных инъекций, начиная с возраста 4 месяцев. У мышей K3, обработанных антителом IgG2a/k к pS404, наблюдали уменьшение количества положительных по тау-белку нейрофибрилярных включений. Оба pS404-специфичные антитела были способны уменьшать уровень pS422-положительного тау-белка, тогда как у мышей, обработанных панспецифическим антителом к тау-белку, уменьшение не наблюдалось. Эти исследования позволяют предположить, что: 1) очищение от тау-белка может зависеть от изотипа антитела и 2) может быть важным целенаправленное воздействие на молекулы тау-белка, имеющие отношение к заболеванию, поскольку общее антитело к тау-белку было не способно уменьшать уровни гиперфосфорилированного тау-белка (PCT/US 2014/025044).

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что антитела, специфичные к фосфорилированному сериновому остатку 396 тау-белка (pS396), являются эффективными в моделях заболеваний; в этом состоит отличие от антител из предшествующего уровня техники, которые распознают главным образом тау-белки, фосфорилированные как по остатку 396, так и по остатку 404, фосфорилированные только по остатку 404 или по другим остаткам тау-белка.

Авторы настоящего изобретения разработали антитела, которые дополнительно характеризуются значительной специфичностью и селективностью в отношении патологического человеческого тау-белка. Антитела по настоящему изобретению демонстрируют намного более высокую степень специфичности и селективности в отношении патологического человеческого тау-белка по сравнению с непатологическим тау-белком, чем антитела из WO 2013/050567 (см. фиг. 1 из WO 2013/050567). Образование антител из WO 2012/045882, которые, как сообщалось, характеризуются специфичным связыванием, вызывалось в ответ на аминокислотные последовательности с 6-9 остатками из аминокислот 393-401, 396-401, 394-400 и 393-400 тау-белка. Это входит в противопоставление с антителами по настоящему изобретению, образование которых происходит в ответ на патогенный гиперфосфорилированный тау-белок, содержащий более длинную аминокислотную последовательность, описанную в данном документе.

Дополнительно антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению демонстрируют множество преимущественных признаков, таких как способность к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и, в частности, к связыванию с тау-

белком, ассоциированным с альцгеймеровской (AD) патологией. В электрофизиологических исследованиях антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению были дополнительно способны устранять уменьшенные парное облегчение и самопроизвольный миниатюрный возбуждающий синаптический ток (mEPSC).

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам и их эпитопсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с фосфорилированным сериновым остатком 396 человеческого тау-белка (изоформы 2N4R) (SEQ ID NO: 1). Антитела дополнительно характеризуются своей способностью различать фосфорилированные остатки 396 и 404, так что они практически не связываются с фосфорилированным остатком 404.

Антитела по настоящему изобретению являются селективными в отношении патологического тау-белка в присутствии непатологического, но при этом фосфорилированного, тау-белка. Антитела по настоящему изобретению способны вызывать селективное истощение клубков тау-белка из патологического тау-белка в присутствии нормального тау-белка. Без ограничения какой-либо конкретной теорией полагают, что истощение клубков тау-белка, содержащих тау-белок, который был фосфорилирован в положении 396 тау-белка, предупреждает затравочное действие патологического тау-белка с образованием клубков тау-белка. Соответственно один аспект настоящего изобретения относится к антителу, способному селективно связываться с фосфорилированным в положении 396 тау-белком даже в тех случаях, когда такие молекулы находятся в присутствии тау-белка, который был фосфорилирован в положении 404 тау-белка. Связанный аспект настоящего изобретения относится к антителу, способному селективно связываться с фосфорилированным в положении 396 тау-белком даже в тех случаях, когда такие молекулы находятся в присутствии непатогенного тау-белка. Как определено дополнительно, настоящее изобретение относится к антителу, селективному в отношении патологического тау-белка, при этом указанный патологический тау-белок является гиперфосфорилированным тау-белком, появляющимся в виде полосы, соответствующей 64 кДа (в вестерн-блот-анализе), у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих изоформу 2N4R человеческого тау-белка.

Один аспект настоящего изобретения направлен на антитело к тау-белку, которое при применении с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей rTg4510 специфично уменьшает полосы гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа на по меньшей мере 90%, уменьшая при этом полосу тау-белка размером 55 кДа не более чем на 10%. Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на антитело к тау-белку, которое специфично уменьшает полосы гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90%, уменьшая при этом полосу тау-белка размером 55 кДа не более чем на 10%; или которое при применении согласно описанному в данном документе с посмертными экстрактами головного мозга от людей с AD обладает способностью к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного в pS396 тау-белка по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полос негиперфосфорилированного тау-белка более чем на 10%.

Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ лечения пациента с таупатией, такой как болезнь Альцгеймера, включающий истощение клубков или ослабление прогрессирования образования указанных клубков, при этом указанные клубки содержат гиперфосфорилированный тау-белок, при этом указанный способ включает приведение гиперфосфорилированного тау-белка в контакт с антителом по настоящему изобретению таким образом, что клубки истощаются, содержание в них гиперфосфорилированного тау-белка уменьшается или прогрессирование образования клубков ослабляется.

Как определено в качестве альтернативы, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента с таупатией, такой как болезнь Альцгеймера, при этом указанный способ включает приведение клубков в контакт с антителом, селективным в отношении тау-белка, имеющего фосфорилированный остаток 396, таким образом, что в клубках происходит истощение по гиперфосфорилированному тау-белку.

Один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело к гиперфосфорилированному человеческому тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 46;

(b) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 47;

(c) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 48;

(d) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 55;

(e) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 56; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57.

Один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело к гиперфосфорилированному человеческому тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (а) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23; и
- (b) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело к гиперфосфорилированному человеческому тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (а) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Представляющий интерес аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело к гиперфосфорилированному человеческому тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (а) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и дополнительно содержащие по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Представляющий интерес аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело к гиперфосфорилированному человеческому тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (а) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39; и дополнительно содержащие по меньшей мере одно из
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и дополнительно содержащие по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять в лечении таупатий, таких как болезнь Альцгеймера (AD), болезнь аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальная дегенерация (CBD), ТБИ (травматическое повреждение головного мозга легкой, острой или хронической форм) и хроническая травматическая энцефалопатия (CTE).

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению дополнительно предназначены для применения в лечении психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, и апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Жидкофазный анализ ингибирования захвата антигенов P3 из материала от субъектов с AD с применением гуманизированного C10-2 и вариантов (C10-2_N32S и C10-2_N32S_A101T). Как описано в примере 3A, исследовали зависимость от концентрации ингибирование захвата антигенов P3 из материала от субъектов с AD P396-специфичными антителами hC10-2 (квадратики), hC10-2_N32S (черные кружки) и hC10-2_N32S_A101T (белые кружки). Фракцию P3 из материала от субъектов с AD инкубировали 60 мин при комнатной температуре (к.т.) с возрастающими концентрациями антител (0-1000 нМ) перед инкубацией с 200 нг/мл мышинового антитела C10-2, иммобилизованного на 96-луночных планшетах. Захваченные антигены P3 из материала от субъектов с AD выявляли с помощью меченого SULFO-TAG антитела к общему тау-белку (MSD).

Рассчитанные значения IC₅₀ антител hC10-2_N32S (черные кружки) и hC10-2_N32S_A101T (белые кружки) составляли 44 нМ и 14 нМ соответственно. Это является заметным улучшением по сравнению с hC10-2, как можно увидеть при сравнении кривых на фиг. 1. Соответственно в одном аспекте настоящего изобретения антитела ингибируют P3 из материала от субъектов с AD в жидкофазном анализе ингибирования, описанном в данном документе, таким образом, что сигнал уменьшается на 50% при концентрации антитела, составляющей 100 нМ или меньше, исходя из жидкофазного анализа ингибирования захвата антигенов P3 из материала от субъектов с AD.

Фиг. 2. Анализ ингибирования пептида, иллюстрирующий кажущуюся аффинность hC10-2 и родственных вариантов. Как описано в примере 3В, зависимость от концентрации ингибирования связывания антитела в растворе жидкой фазы с пептидом Ptau 386-408 (pS396) исследовали с антителами hC10-2 (квадратики), hC10-2_N32S (черные кружки) и hC10-2_N32_A101T (белые кружки). Антитела предварительно инкубировали при 1 нг/мл в течение 60 мин. при к. т. с возрастающими концентрациями (0-10000 нМ) Ptau 386-408 (pS396) перед инкубированием в лунках, покрытых 100 нг/мл Ptau 386-408 (pS396/pS404). Связанное с лунками антитело выявляли с помощью меченого SULFO-TAG антитела к IgG человека (MSD).

Как можно увидеть из фиг. 2, антитело hC-10.2 ($IC_{50} = 24$ нМ), антитело hC10.2_N32S ($IC_{50} = 50$ нМ) и антитело hC10.2_N32S_A101T ($IC_{50} = 34$ нМ) характеризуются значениями IC_{50} , составляющими менее 100 нМ и даже менее 60 нМ, исходя из исследований кажущейся аффинности с применением раствора жидкой фазы с Ptau (P396) 386-408.

Фиг. 3 (панели A-Z и AA-AG). Иммуногистохимическое выявление патологического тау-белка в образцах головного мозга, полученных посмертно от доноров с AD, и в головном мозге от мышей rTg4510. Как описано в примере 4, в префронтальной коре от 3 различных доноров с AD hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T метили нейрофибрилярные клубки, нити нейропиля и дистрофические нейриты. Наиболее высокие интенсивности окрашивания выявляли при наиболее высоких концентрациях антитела. В контрольных срезах головного мозга не наблюдалась иммунореактивность. Все 3 антитела метили фосфорилированный тау-белок в головном мозге от rTg4510 с запущенной формой патологии.

Окрашивание усиливалось в направлении от hC10-2 к hC10-2_N32S и к hC10-2_N32S_A101T. Наиболее высокие интенсивности окрашивания выявляли в случае hC10-2_N32S_A101T, затем hC10-2_N32S и затем hC10-2. Иммуногистохимическое выявление патологического тау-белка в образцах головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера наблюдали при концентрациях не более 100 нг/мл hC10-2_N32S_A101T и hC10-2_N32S.

Фиг. 4 (панели A-F). Окрашивание структур тау-белка у мышей rTg4510, обработанных hC10-2. hC10.2 вводили i.v. (На панелях A, C, E и F представлены rTg4510; на панелях B и D представлены tTA). Мыши получали однократную инъекцию антител hC10-2 при концентрации 80 мг/кг в объеме 150 мкл. Срезы головного мозга получали через 3 дня согласно способу, описанному в примере 5. hC10-2 специфично метило целевые структуры in vivo в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга rTg4510, но не из контрольных образцов головного мозга tTA. Изображения с наложением сигналов AlexaFluor488 и Hoechst показаны на срезах гиппокампа.

Фиг. 5 (панели A-F). Окрашивание структур тау-белка у мышей rTg4510, обработанных hC10-2_N32S. (На панелях A, C и E представлены rTg4510; на панелях B, D и F представлены tTA). Мыши получали однократную инъекцию антител hC10-2_N32S при концентрации 80 мг/кг в объеме 150 мкл. Срезы головного мозга получали через 3 дня согласно способу, описанному в примере 5. hC10-2_N32S специфично метило целевые структуры in vivo в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга rTg4510, но не из контрольных образцов головного мозга tTA. Изображения с наложением сигналов AlexaFluor488 и Hoechst показаны на срезах гиппокампа.

Фиг. 6 (панели A-F). Окрашивание структур тау-белка у мышей rTg4510 после i.v. инъекции hC10-2_N32S_A101T. (На панелях A, C и E представлены rTg4510; на панелях B, D и F представлены tTA). Мыши получали однократную инъекцию антител hC10-2_N32S_A101T при концентрации 80 мг/кг в объеме 150 мкл. Срезы головного мозга получали через 3 дня согласно способу, описанному в примере 5. hC10-2_N32S_A101T специфично метило целевые структуры in vivo в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга rTg4510, но не из контрольных образцов головного мозга tTA. Изображения с наложением сигналов AlexaFluor488 и Hoechst показаны на срезах гиппокампа.

Сравнение фиг. 4-6 указывает на то, что hC10.2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T проникают через гематоэнцефалический барьер при внутривенной инъекции. Фигуры дополнительно указывают, что hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T метили структуры тау-белка (иммунореактивные в отношении клубков тау-белка) в гиппокампе и коре головного мозга с улучшенными результатами по сравнению с hC10-2.

Фиг. 7 (панели A-D). Молекулы тау-белка, распознаваемые pS396-специфичными антителами в головном мозге от субъектов с болезнью Альцгеймера (AD). Как описано в примере 6, в срезах головного мозга от субъектов с AD клубки тау-белка были либо совместно мечеными антителами к E1 и p396, либо положительными только для антител к pS396 (стрелки). Срезы анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Ряд клубков тау-белка метили только антитела hC10-2 либо антитела hC10-2_N32S_A101T (стрелки). Учитывая, что не поддающиеся выявлению клубки не окрашиваются антителами к N-концевому фрагменту тау-белка, молекулы тау-белка, меченные антителами hC10-2 или hC10-2_N32S_A101T в отдельности, вероятно, представляют внеклеточные не поддающиеся выявлению клубки.

Фиг. 8A-8C. Выявление патологического тау-белка с помощью вестерн-блоттинга. Как описано в примере 6, разделе "Выявление патологического тау-белка с помощью вестерн-блоттинга", патологический тау-белок выявляли с помощью вестерн-блоттинга с использованием hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-

2_N32S_A101T. Объединенные образцы переднего мозга от трех мышей rTg4510 и таковые от нетрансгенных (отличных от Tg) контрольных однопометных животных, умерщвленных в возрасте 32 недель, и объединенные образцы коры головного мозга от четырех доноров с AD и таковые от четырех здоровых контрольных (HC) доноров соответственно фракционировали на растворимые (S1) фракции, фракции растворимого в TBS осадка (S1p) и нерастворимые в саркозиле (P3) фракции и анализировали с помощью вестерн-блоттинга в отношении фосфорилированного эпитопа pS396 тау-белка с использованием 1 мкг/мл hC10.2(A), hC10-2_N32S (B), hC10-2_N32S_A101T (C). В случае rTg4510 нормальный человеческий тау-белок 4R0N отображался при 55 кДа, тогда как гиперфосфорилированные молекулы тау-белка отображались при 64 и 70 кДа. В случае AD гиперфосфорилированные молекулы тау-белка отображались в виде четырех полос, соответствующих 54, 64, 69 и 74 кДа, при различном количестве типичного для AD пятна.

Каждое из hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T было селективным в отношении тау-белков мышей rTg4510 по сравнению с нетрансгенными мышами и в отношении тау-белков доноров с AD по сравнению со здоровыми контрольными донорами. Кроме того, в растворимых (S1) фракциях, фракциях растворимого в TBS осадка (S1p) и нерастворимых в саркозиле (P3) фракциях каждое из hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T было селективным в отношении патогенного тау-белка размером 64 кДа от мышей rTg4510 по сравнению с нормальным тау-белком размером 55 кДа от мышей rTg4510.

Фиг. 9. Иммунопреципитация тау-белка из образцов головного мозга от субъектов с AD. Как описано в примере 6, разделе "Иммунопреципитация патологического тау-белка", иммунопреципитацию тау-белка с использованием 10 мкг hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T, с использованием контрольного IgG1 человека (hIgG1) из 500 мкг предварительно очищенных лизатов гомогенатов коры головного мозга, объединенных от четырех доноров с AD и здоровых контрольных (HC) доноров, анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием поликлонального кроличьего антитела к тау-белку pS396 (тау-белок pS396). В случае AD гиперфосфорилированные молекулы тау-белка отображались в виде четырех полос, соответствующих 54, 64, 69 и 74 кДа, при различном количестве типичного для AD пятна.

Фиг. 10A-C. Количественная оценка агрегации тау-белка с помощью анализа Cisbio. Затравочный материал дикого типа (Wt) (WW) не продемонстрировал затравочного действия, и фоновый сигнал вычитали из всех затравочных образцов. Гомогенаты от Tg4510 характеризовались эффективным затравочным действием, и на затравочный эффект не влияла обработка с помощью B12, однако на него в различной степени влияла обработка в исследованиях затравочного действия, проводимых с использованием антител к тау-белку по настоящему изобретению (hC10-2_N32S_A101T > hC10-2_N32S > hC10-2) при концентрации 20 мкг/мл. На графических изображениях представлены результаты четырех независимых групп экспериментов, и они выполнены в виде диаграммы относительной агрегации тау-белка (кратности сигнала относительно фонового уровня, нормализованной к общему белку), и относительное содержание нерастворимого тау-белка p396 количественно оценивали с помощью денситометрии вестерн-блотов нерастворимой в Triton-X фракции (нормализованная кратность сигнала по отношению к фоновому уровню). Все образцы нормализовали по отношению к антителу изотипического контроля B12. На фиг. 10B-C представлена количественная оценка агрегации тау-белка с помощью анализа Cisbio. Клетки НЕК293, трансфицированные pcDNA для введения затравки, не продемонстрировали сигнал, что подтверждало отсутствие выявления входящего затравочного материала. Затравочный материал Wt (дикого типа) (WW) не продемонстрировал затравочного действия, однако, в отличие от этого, гомогенаты от rTg4510 (CC) характеризовались эффективным затравочным действием по сравнению с лишенными затравки. На этот затравочный эффект не влияла обработка с помощью HEL, но он частично устранялся путем обработки антителами к тау-белку (C10-2 > D1.2 > hAC136-2B6-Ab1). На графических изображениях представлены три независимых набора образцов, и они выполнены в виде диаграммы относительной агрегации тау-белка (кратности сигнала относительно фонового уровня, нормализованной по отношению к общему белку). В примере 6, разделе "Клеточный анализ и анализ агрегации", описан следующий протокол.

Фиг. 11. Количественная оценка сигнала Tau5 в вестерн-блоттинге после иммуноистощения экстрактов головного мозга от субъектов с AD с применением различных количеств антител hC10-2 и 2.10.3. Как описано в примере 7, оба антитела удаляли небольшую долю общего тау-белка из экстрактов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера.

Фиг. 12. Количественная оценка сигнала тау-белка P-S422 в вестерн-блоттинге после иммуноистощения экстрактов головного мозга от субъектов с AD с применением различных количеств антител hC10-2 (ромбы) и 2.10.3 (треугольники). На фиг. показаны результаты из примера 7. Тау-белок, фосфорилированный по серину-422, может эффективно удаляться из экстрактов головного мозга от субъектов с AD в результате иммуноистощения с применением hC10-2 либо 2.10.3. Оба антитела приводили к удалению более 90% тау-белка P-S422, хотя для достижения такого же эффекта требовалось большее количество антитела 2.10.3.

Фиг. 13. Количественная оценка сигнала тау-белка pS396 в вестерн-блоттинге после иммуноисто-

щения экстрактов головного мозга от субъектов с AD с применением различных количеств антител hC10-2 и 2.10.3. На фиг. показаны результаты из примера 7. Иммуноистощение с помощью hC10-2 приводило к удалению 88% тау-белка, фосфорилированного по серину-396, тогда как 2.10.3 приводило к удалению лишь 55% тау-белка pS396 из экстрактов головного мозга от субъектов с AD.

Фиг. 14. Количественная оценка сигнала тау-белка P-S199/202 в вестерн-блоттинге после иммуноистощения экстрактов головного мозга от субъектов с AD с применением различных количеств антител hC10-2 и 2.10.3. На фигуре показаны результаты из примера 7. Иммуноистощение с помощью hC10-2 приводило к очищению 69% тау-белка, фосфорилированного по серину-199/202. Антитело 2.10.3 не приводило к такому же дозозависимому уменьшению.

Фиг. 15. Картины вестерн-блоттинга экстрактов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера до и после иммуноистощения. На фиг. показаны результаты из примера 7. Присутствует фрагмент тау-белка, фосфорилированного по серину-396, размером 25 кДа. Иммуноистощение с помощью hC10-2 приводило к уменьшению полосы тау-белка размером 25 кДа. 2 других фосфоспецифичных антитела 2.10.3 и AT8 не приводили к удалению этой молекулы размером 25 кДа.

Фиг. 16. Количественная оценка сигнала тау-белка pS396 в вестерн-блоттинге после иммуноистощения экстрактов головного мозга от субъектов с AD с применением различных количеств вариантов hC10-2 N32S, N32Q, N32S_A101T, N32Q_A101T, N32Q_D55E и N32S_D55E. Как можно сделать вывод из примера 8, способность антител по настоящему изобретению к удалению тау-белка, фосфорилированного по серину-396, из гомогенатов головного мозга от субъектов с AD, была существенной. При содержании менее 0,1 мкг антитела (точка замера при 75 нг) варианты приводили к уменьшению сигнала pS396 по меньшей мере на 28% (за исключением N32Q, D55E, который характеризовался 16%), тогда как C10.2 приводило к уменьшению сигнала pS396 на менее чем 6%.

Фиг. 17 (панели A-D). Затравка клубков тау-белка в гиппокампе, вызванная инъекцией экстрактов головного мозга от субъектов с AD. Как изложено в примере 8а, при дозе 15 мг/кг обработка с помощью mC10-2 значимо уменьшала патологию клубков в подвергнутом затравочному действию гиппокампе на 57% ($P < 0,05$). Наблюдалась отчетливая тенденция, указывающая на то, что hC10-2 также уменьшало патологию. Для сравнения 2.10.3 не характеризовалось эффектом при той же дозе.

Фиг. 18. Остатки P-Ser396 и Tyr394 находятся в центре антигенсвязывающего участка

Показана структура Ile(392)-Val(393)-Tyr(394)-Lys(395)-pSer(396)-Pro(397)-Val(398). В основном взаимодействии с антителом по настоящему изобретению участвует гидрофобный карман, pSer396 и Y394 тау-белка. Существуют разветвленная сеть водородных связей, образующаяся между боковой цепью с Y(394) и остовом из фосфоната с pSer396, и взаимодействия зарядов/полярные взаимодействия между ними. CDR1 HC антител по настоящему изобретению содержит палиндромный мотив из 8 остатков Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота - Заряженная аминокислота - Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота (Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-Thr-Ile-His). Заряженные остатки взаимодействуют посредством разветвленной сети связей, образованной водородными связями, взаимодействий зарядов, и взаимодействий зарядов/полярных взаимодействий между антителом и тау-белком.

Фиг. 19. Эффективность антител в парадигме лечения

Как изложено в примере 8b, клетки HEK293, экспрессирующие hTau-P301L, подвергали затравочному действию гомогенатов от Tg4510, предварительно инкубированных с указанными антителами, трипсинизировали и подвергали повторному затравочному действию через 24 ч (антитела повторно добавляли) и собирали через 48 ч после подвергания затравочному действию. Общие клеточные гомогенаты исследовали в отношении агрегированного тау-белка с помощью анализа агрегации тау-белков от Cisbio. Данные представляют собой объединенные данные от 4 независимых биологических повторов +/- S.E.M., нормализованные по отношению к CC+B12 (tg4510).

Клетки, экспрессирующие P301L-htau, подвергали затравочному действию 40 мкг гомогената головного мозга от Tg4510 (общий белок), предварительно инкубированного в течение ночи при 4°C с антителами (20 мкг/мл ~ 133 нМ) в 6-луночных планшетах. Затравка с помощью CC+B12 приводила к значительному затравочному ответу. hC10.2 оказывало примерно 40% влияние на агрегацию. Все другие антитела демонстрировали по меньшей мере сопоставимый с hC10.2 эффект. В частности, варианты hC10.2 N32S и N32S_A101T демонстрировали более выраженные эффекты в виде уменьшенной агрегации тау-белка на 45% и 62%. Вариант N32S_A101T демонстрировал значимо более выраженный эффект в отношении агрегации по сравнению с hC10.2. На фиг. показано, что гуманизированное C10.2 является эффективным при вовлечении индуцированного тау-белком затравочного действия, однако добавление N32S и, в частности, двойной мутации N32S и A101T повышает нейтрализующую активность mAb.

Фиг. 20. Исследования по дезамидированию вариантов в стрессовых условиях

Как изложено в примере 8с, дезамидирование остатков Asn в положении 32 или 34 VL-цепи контролировали путем анализа триптического пептида LC:T2 [VTMTCCASQDTSIXLNWFQQKPGK; SEQ ID NO: 58] с помощью LC-MS. X представляет собой Asn, Gln либо Ser в соответствующих вариантах, указанных на фиг. 20. MS анализ позволяет выполнить расчет относительного содержания дезамидированных пепти-

дов по отношению к недезамидированным. В случае WT, вариантов A101T и D55E наблюдается существенное дезамидирование в пептиде LC:T2. Также очевидно, что изменение Asn32 либо на Gln, либо на Ser полностью предотвращает дезамидирование пептида по другим остаткам Asn34. Также не выявляли никакого дезамидирования вариантов Gln32. Аналогичные результаты наблюдали в случае вариантов Asn34.

Фиг. 21. Уменьшение затравочного действия и агрегации тау-белка в кортикальных нейронах с помощью антител к тау-белку

Затравочное действие и агрегацию тау-белка в культурах кортикальных нейронов из эмбрионов мышей rTg4510 индуцировали с помощью 0,2 нг патологического тау-белка из фракций P3 или S1 р от 40-недельных мышей rTg4510 и измеряли с помощью анализа агрегации тау-белка C10-2. На 7-й день культивирования (DIV) нейроны обрабатывали смесью P3 или S1p и 10 мкг антитела или фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Полное изменение среды осуществляли на DIV11 с удалением остаточных затравок P3 и S1p и антител. Затравку тау-белка обеспечивали в течение дополнительных 4 дней, и нейроны подвергали лизису на DIV15 с измерением затравочного действия и агрегации тау-белка. PBS и контрольное антитело IgG человека (контр, ab IgG) не влияли на затравочное действие и агрегацию тау-белка. Затравочное действие и агрегация тау-белка частично обращались путем обработки антителами к тау-белку (hC10.2_A101T_N32S > hC10.2_N32S > hC10.2). Измеряли следующее уменьшение затравочного действия и агрегации тау-белка: 23% - в случае hC10.2, 41-53% - в случае hC10.2_N32S и 48-60% - в случае hC10.2_A101T_N32S. На столбиковых диаграммах представлены данные из двух независимых экспериментов по агрегации тау-белка, нормализованные по отношению к нейрональному белку, в виде средних значений $\pm$ SD. Использовали однофакторный ANOVA и критерий Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений (PBS/контр, ab IgG в сравнении с hC10.2, hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S, *** p <0,001; hC10.2 и hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S, ### p <0,001).

Фиг. 22. Дозозависимое окрашивание структур тау-белка у мышей rTg4510 после i.v. инъекции hC10-2_N32S.

hC10-2_N32S специфично метило целевые структуры in vivo в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга rTg4510. Показаны изображения передней поясной коры головного мозга. Наиболее сильные сигналы наблюдали при дозе 20 и 80 мг/кг, слабые сигналы - при дозе 8 мг/кг, отсутствие видимого сигнала - при дозе 0,8 мг/кг.

Фиг. 23. Вызванная затравочным действием патология тау-белка в гиппокампе

Число клеток, характеризующихся окрашиванием клубков по Gallyas, в подвергнутом затравочному действию гиппокампе, уменьшалось посредством обработки с помощью hC10-2 (50%), hC10-2_N32S (48%) и hC10-2_N32S_A101T (47%). Количественную оценку выполняли в каждом 6-х срезах, охватывающих дорсальный гиппокамп, всего использовали 8 срезов на животное. Число клеток отражает сумму положительных клеток во всех подобластях гиппокампа, идентифицированных в 8 срезах. Для анализа данных использовали однофакторный ANOVA и критерий Данетта для множественных сравнений.

Последовательности, включенные посредством ссылки

SEQ ID NO: 1 человеческий тау-белок (2N4R)
 SEQ ID NO: 2 остатки 386-408 тау-белка (pS396, pS404)
 SEQ ID NO: 3 CDR1 легкой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 4 CDR2 легкой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 5 CDR3 легкой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 6 CDR1 тяжелой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 7 CDR2 тяжелой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 8 CDR3 тяжелой цепи C10-2
 SEQ ID NO: 9 легкая цепь мышиноного C10-2
 SEQ ID NO: 10 тяжелая цепь мышиноного C10-2
 SEQ ID NO: 11 тяжелая цепь гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 12 легкая цепь гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 13 вариант D55E тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 14 вариант D55Q тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 15 вариант D55S тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 16 вариант N32S легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 17 вариант N32Q легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 18 вариант N34S легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 19 вариант N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 20 вариант N32S, N34S легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 21 вариант N32Q, N34S легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 22 вариант N32Q, N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 23 вариант N32S, N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 24 вариант A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2

SEQ ID NO: 25 вариант D55E, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 26 вариант D55Q, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 27 вариант D55S, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 28 вариант D55E CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 29 вариант D55Q CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 30 вариант D55S CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 31 вариант N32S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 32 вариант N32Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 33 вариант N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 34 вариант N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 35 вариант N32S, N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 36 вариант N32Q, N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 37 вариант N32Q, N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 38 вариант N32S, N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 39 вариант A101T CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 SEQ ID NO: 40 CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 41 CDR2 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 42 CDR3 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 43 CDR1 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 44 CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 45 CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 46 вариант N32S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 47 вариант N32S CDR2 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 48 вариант N32S CDR3 легкой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 49 вариант A101T CDR1 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 50 вариант A101T CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 51 вариант A101T CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации IMGT
 SEQ ID NO: 52 CDR1 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia
 SEQ ID NO: 53 CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia
 SEQ ID NO: 54 CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia
 SEQ ID NO: 55 вариант A101T CDR1 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia
 SEQ ID NO: 56 вариант A101T CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia
 SEQ ID NO: 57 вариант A101T CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2 согласно нумерации Chotia

Подробное описание изобретения

Используемый в данном документе термин "тау" является синонимом "тау-белка" и относится к любой из изоформ тау-белка (идентифицированных, например, в UniProt как P10636, 1-9). Нумерация аминокислот тау-белка, используемая в данном документе, приведена применительно к изоформе 2 (SEQ ID NO: 1), показанной ниже, при этом метионин (M) является аминокислотным остатком 1. SEQ ID NO: 1:

```
MAEPQREFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
GSPGTPGSRS RTPSLTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
PGGGSVQIVY KPVDSLKVT S KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGNNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L
```

Настоящее изобретение относится к антителам и их эпитопсвязывающим фрагментам, которые способны специфически связываться с тау-белком, и в частности, с человеческим тау-белком, и в одном варианте осуществления проявляют способность к специфичному связыванию с фосфорилированным остатком S396 (pS396) человеческого тау-белка. Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению дополнительно характеризуются тем, что они не способны или практически не способны специфически связываться с фосфорилированным сериновым остатком 404 (pS404) в человеческом тау-белке, например, в условиях ограниченного количества антител или ненасыщающих условиях. Дополнительно фосфорилирование в pS404 не препятствует специфичному связыванию с pS396-содержащими эпитопами. Используемые в данном документе обозначения "pS" и "^{ip}S" означают фосфосериновый аминокислотный остаток и последующие номера определяют положение остатка по отноше-

нию к последовательности под SEQ ID NO: 1. Как используется в данном документе, антитело "практически" не способно связываться с эпитопом, если относительно другого эпитопа такое связывание составляет менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 2% и более предпочтительно менее 1% от связывания, наблюдаемого для такого другого эпитопа.

Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина или, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, фрагменту молекулы иммуноглобулина, которые обладают способностью к специфичному связыванию с эпитопом молекулы ("антигена"). Встречающиеся в природе антитела обычно предусматривают тетрамер, который обычно состоит по меньшей мере из двух тяжелых цепей (HC) и по меньшей мере двух легких цепей (LC). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (сокращенно называемого в данном документе VH) и константного домена тяжелой цепи, обычно состоящего из трех доменов (CH1, CH2 и CH3). Человеческие тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, включая IgG (подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (сокращенно называемого в данном документе VL) и константного домена легкой цепи (CL). Человеческие легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи. Вариабельный домен тяжелой и легкой цепей обычно отвечает за распознавание антигена, тогда как константный домен тяжелой и легкой цепей может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классического пути активации системы комплемента. VH- и VL-домены могут дополнительно подразделяться на гипервариабельные домены, называемые "областями, определяющими комплементарность", которые чередуются с доменами с более консервативной последовательностью, называемыми "каркасными областями" (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR-доменов и четырех FR-доменов, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные домены тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Особенно значимыми являются антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты, которые были "выделены" таким образом, чтобы они существовали в физической среде, отличающейся от той, в которой они могут встречаться в природе, или которые были модифицированы таким образом, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от встречающегося в природе антитела или его эпитопсвязывающих фрагментов.

Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и линейные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, всегда утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, эффективно блокируемые пептидом, специфично связывающимся с эпитопом (другими словами, аминокислотный остаток находится в пределах области узнавания для пептида, специфично связывающегося с эпитопом).

Используемый в данном документе термин "эпитопсвязывающий фрагмент антитела" означает фрагмент, часть, область или домен антитела (независимо от того, как они получены (например, путем расщепления, рекомбинантным путем, синтетическим путем и т.п.)), которые способны специфично связываться с эпитопом. Эпитопсвязывающий фрагмент может содержать любой из 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR-доменов такого антитела и, несмотря на то, что способен специфично связываться с таким эпитопом, может проявлять специфичность, аффинность или селективность в отношении того эпитопа, который отличается от эпитопа для такого антитела. Однако предпочтительно, чтобы эпитопсвязывающий фрагмент содержал все 6 CDR-доменов такого антитела. Эпитопсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой или содержать часть одной полипептидной цепи (например, в scFv) или может представлять собой или содержать часть двух или более полипептидных цепей, каждая из которых имеет аминоконец и карбоксильный конец (например, в диателе, Fab-фрагменте, Fab₂-фрагменте и т.п.). Фрагменты антител, которые проявляют способность к связыванию с эпитопом, можно получить, например, путем расщепления интактных антител протеазами. Более предпочтительно, чтобы, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, в естественных условиях кодируются отдельными генами или полинуклеотидами, которые кодируют такие последовательности генов (например, их кодирующей кДНК), можно было с помощью рекомбинантных способов соединить гибким линкером, который обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой VL- и VH-области ассоциируют друг с другом с образованием одновалентных эпитопсвязывающих молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5879-5883). В качестве альтернативы, путем использования гибкого линкера, который является слишком коротким (например, имеет длину менее чем приблизительно 9 остатков) для того, чтобы обеспечить возможность ассоциации VL- и VH-доменов одной полипептидной цепи друг с другом, можно образовать биспецифическое антитело, диатело или аналогичную молекулу (в которой две такие по-

липептидные цепи ассоциируют друг с другом с образованием двухвалентной эпитопсвязывающей молекулы (см., например, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) в отношении описания диател). Примеры эпитопсвязывающих фрагментов, охватываемых настоящим изобретением, включают (i) Fab'- или Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782; (ii) F(ab')₂-фрагменты - двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном домене; (iii) Fd-фрагмент, по сути состоящий из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, по сути состоящий из VL- и VH-доменов, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который по сути состоит из VH-домена и также называется доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(II): 484-90); (vi) антитела верблюдовых или нанотела (Revs et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5_1(I): 1 II-24) и (vii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Дополнительно, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их с помощью рекомбинантных способов можно соединить синтетическим линкером, который обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой VL- и VH-домены находятся в паре, с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Эти и другие фрагменты антител, применимые в контексте настоящего изобретения, дополнительно обсуждаются в данном документе. Также следует понимать, что термин "антитело", если не указано иное, также включает антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность к специфичному связыванию с антигеном (эпитопсвязывающие фрагменты), получаемые с помощью любой известной методики, такой как ферментативное расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные методики. Полученное антитело может иметь любой изотип. Как используется в данном документе, "изотип" относится к классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), кодируемому генами константных доменов тяжелых цепей. Такие фрагменты антител получают с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники; при этом подходящие фрагменты, способные связываться с желаемым эпитопом, можно без труда подвергнуть скринингу в отношении полезности таким же образом, как и интактное антитело. В одном варианте осуществления Fc-область антител по настоящему изобретению содержит мутацию, которая модулирует эффекторные функции.

Термин "биспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему два независимых эпитопсвязывающих фрагмента, каждый из которых нацеливается на независимые мишени. Эти мишени могут представлять собой эпитопы, присутствующие в различных белках, или различные эпитопы, присутствующие в одной и той же мишени. Молекулы биспецифических антител можно получить с помощью компенсаторных аминокислотных изменений в константных доменах HC исходных молекул моноспецифических двухвалентных антител. Полученное в результате гетеродимерное антитело содержит один Fab, вклад в образование которого вносят два разных исходных моноспецифических антитела. Аминокислотные изменения в Fc-домене приводят к повышенной стабильности гетеродимерного антитела с биспецифичностью, которая стабильна течением времени. (Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-1(2010), Moore et al., MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop et al., JMB 420, 204-219 (2012), Metz et al., Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145-5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646-654 (2013)). Биспецифические антитела также могут включать молекулы, получаемые с помощью слияний ScFv. Затем два моноспецифических scfv независимо соединяют с Fc-доменами, которые могут образовывать стабильные гетеродимеры, с получением одной биспецифической молекулы (Mabry et al., PEDS 23:3 115-127 (2010)). Биспецифические молекулы обладают способностями к двойному связыванию.

Термины "C10-2", "человеческое C10-2", "hC10-2", "HC10-2", "hC10.2", "Гуманизированное C10-2" и "гуманизированное C10-2", как используется в данном документе и на фигурах, подразумеваются как синонимы и определяются как антитело C10-2. Данный термин подразумевает как означающий антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен легкой цепи антитела, имеющий:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, имеющий:
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, или состоящие из них.

Антитело C10-2 представляет собой гуманизированное антитело, которое может быть определено как содержащее тяжелую цепь под SEQ ID NO: 11, легкую цепь под SEQ ID NO: 12 или обе. Один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь под SEQ ID NO: 11 и легкую цепь под SEQ ID NO: 12.

става. Традиционная композиция на основе моноклональных антител характеризуется единой специфичностью связывания и аффинностью к конкретному эпитопу. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело может состоять из более чем одного Fab-домена, за счет чего повышается специфичность более чем к одной мишени. Термины "моноклональное антитело" или "композиция на основе моноклональных антител" не подразумеваются как ограниченные каким-либо конкретным способом получения (например, рекомбинантным, трансгенным, гибридным и т.п.).

Антитела по настоящему изобретению и их эпитопсвязывающие фрагменты предпочтительно являются "гуманизированными", в частности, если они используются для терапевтических целей. Термин "гуманизированный" относится к молекуле, обычно получаемой с помощью рекомбинантных методик, которая имеет эпитопсвязывающий участок, полученный из иммуноглобулина от вида, отличного от человека, и остальную часть структуры иммуноглобулина, в основе которой лежит структура и/или последовательность человеческого иммуноглобулина. Эпитопсвязывающий участок может содержать либо полные переменные домены антитела, отличного от человеческого, слитые с человеческими константными доменами, либо только области, определяющие комплементарность (CDR), или их части, таких переменных доменов, привитые на соответствующие человеческие каркасные области человеческих переменных доменов. Остатки каркасных областей таких гуманизированных молекул могут быть дикого типа (например, полностью человеческими), или они могут быть модифицированы так, чтобы содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые не встречаются в антителе человека, последовательность которого послужила основой для гуманизации. Гуманизация уменьшает или устраняет вероятность того, что константный домен молекулы будет действовать в качестве иммуногена у людей, однако возможность выработки иммунного ответа на чужеродный переменный домен сохраняется (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response" *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224). Другой подход фокусируется не только на получении константных доменов человеческого происхождения, но также и на модификации переменных доменов таким образом, чтобы реконструировать их как можно более близко к человеческой форме. Известно, что переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющие комплементарности области (CDR), которые различаются по ответу на рассматриваемые антигены и определяют способность связывания, фланкированные четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными у данного вида и которые предположительно обеспечивают остов для CDR. В тех случаях, когда антитела, отличные от человеческих, получают в отношении конкретного антигена, переменные домены можно "реконструировать" или "гуманизировать" путем прививания CDR, полученных из антитела, отличного от человеческого, на FR, присутствующие в человеческом антителе, подлежащем модификации. О применении такого подхода к различным антителам сообщалось в Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53: 851-856. Riechmann L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239:1534-1536; Kettleborough C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein Engineering* 4:773-778; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289 и Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", *J. Immunol.* 148:1149-1154. В некоторых вариантах осуществления в гуманизированных антителах сохраняются все последовательности CDR (например, в гуманизированном антителе мыши, которое содержит все шесть CDR из антител мыши). В других вариантах осуществления гуманизированные антитела имеют одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененных по сравнению с исходным антителом, которые также называют одной или несколькими CDR, "полученными из" одной или нескольких CDR исходного антитела. Возможность гуманизации антитела хорошо известна (см., например, патенты США №№ 5225539, 5530101, 5585089, 5859205, 6407213, 6881557).

Термин "антитело "XX" подразумевает как означающий антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент (например, антитело "C10-2"), содержащие: (а) легкую цепь и тяжелую цепь, переменный домен тяжелой цепи либо CDR1-3 переменного домена тяжелой цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, или (b) переменный домен легкой цепи и тяжелую цепь, переменный домен тяжелой цепи либо CDR1-3 переменного домена тяжелой цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, или (с) CDR1-3 переменного домена легкой цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, и тяжелую цепь, переменный домен тяжелой цепи либо CDR1-3 переменного домена тяжелой цепи, определенные по их соответствующему SEQ ID NO, или состоящие из них. В определенных вариантах осуществления антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент определены содержащимися в них полным переменным доменом тяжелой цепи, определенным по его SEQ ID NO, и varia-

бельным доменом легкой цепи, определенным по его SEQ ID NO.

Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константном домене антитела соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом, которая описана в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима лишь часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с соответствующим эпитопом и не содержащиеся в SDR, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований. Например, остатки Tyr, Ser, Gln, Lys, Phe, Gln, соответствующие остаткам 60-65 HC под SEQ ID NO: 11, часто не являются необходимыми для выделения из областей CDR по Kabat (они также встречаются в CDR2 HC (SEQ ID NO: 7), лежащих за пределами гипервариабельных петель по Chothia (см. Kabat et al. (1992) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, публикация № 91-3242; Chothia C et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196:901-917), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем или согласно описанному в Gonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", *Mol. Immunol.* 41:863-872. В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствуют один или несколько остатков донорного CDR или в которых весь донорный CDR пропущен, аминокислота, занимающая положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (согласно нумерации по Kabat) в акцепторной последовательности антитела. Количество таких замен акцепторных аминокислот на донорные в CDR, которые нужно включить, отражает баланс альтернативных мнений. Такие замены являются потенциально преимущественными для снижения количества мышиных аминокислот в гуманизированном антителе и снижения вследствие этого потенциальной иммуногенности. Тем не менее, замены также могут обуславливать изменения аффинности, и значительного уменьшения значений аффинности предпочтительно избегают. Положения для замены в пределах CDR и подлежащие замене аминокислоты также можно выбрать эмпирическим путем.

Антитела также характеризуют согласно системе нумерации IMGT, которая четка определена в уровне техники. Длина (по числу аминокислот, т.е. по числу занимаемых положений) является важным и исходным понятием IMGT-ONTOLOGY (<http://www.imgt.org>). По значениям длины CDR-IMGT характеризуют IG и V-ОБЛАСТИ TR генов зародышевой линии и V-ДОМЕНЫ реаранжированных генов, кДНК и белки.

Например, антитела можно характеризовать согласно схеме нумерации Chothia <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. Схема нумерации Chothia является идентичной схеме Kabat, однако происходят вставки в CDR-L1 и CDR-H1 в структурно определенных положениях. Схема нумерации Chothia основана на положении структурных областей петель. Это означает, что топологически эквивалентные остатки в этих петлях получают одинаковую метку (в отличие от схемы Kabat).

Тот факт, что изменение одной аминокислоты в остатке CDR может привести к утрате функционального связывания (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79(6): 1979-1983), обеспечивает возможность систематической идентификации альтернативных функциональных последовательностей CDR. В одном предпочтительном способе получения таких вариантов CDR полинуклеотид, кодирующий CDR, подвергают мутации (например, посредством случайного мутагенеза или с помощью сайт-направленного способа (например, с амплификацией, опосредованной полимеразной цепной реакцией, с праймерами, которые кодируют мутантный локус)) с получением CDR, имеющего замененный аминокислотный остаток. Путем сравнения идентичности исходной (функциональной) последовательности CDR по соответствующему остатку с идентичностью варианта последовательности CDR с заменой (нефункционального) для этой замены можно определить вес замены согласно BLOSUM62.iiij. В системе BLOSUM представлена матрица аминокислотных замен, создаваемая путем анализа базы данных последовательностей в отношении достоверных выравниваний (Eddy S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8): 1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. В настоящее время наиболее совершенной базой данных BLOSUM является база данных BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). В табл. 1 представлены значения веса замен согласно BLOSUM62.iiij (чем больше вес, тем более консервативной является замена и, следовательно, более вероятно, что замена не будет влиять на функцию). Если эпитопсвязывающий фрагмент, содержащий полученную в результате CDR, не может связываться с тау-белком, например, то полагают, что вес замены согласно BLOSUM62.iiij свидетельствует о ее недостаточной консервативности, и выбирают и производят новую замену-кандидата, имеющую больший вес замены. Так, например, если исходный остаток представлял собой глутамат (E), а нефункциональный заменяющий остаток представлял собой гистидин (H), то вес замены согласно BLOSUM62.iiij будет равен 0, а более консервативные изме-

нения (например, аспартат, аспарагин, глутамин или лизин) являются предпочтительными.

Таблица 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает применение случайного мутагенеза для идентификации улучшенных CDR. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены как замены в пределах классов аминокислот, отраженных в одной или нескольких из табл. 2, 3 или 4.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Таблица 2

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Альтернативные классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Таблица 3

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Таблица 4

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Остатки, связанные с циклоалкенилом	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании изгиба	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Группы более консервативных замен включают валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

Дополнительные группы аминокислот также могут быть составлены с применением принципов, описанных, например, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

В качестве альтернативы можно применять технологию фагового дисплея для повышения (или снижения) аффинности CDR. В этой технологии, называемой созреванием аффинности, используется мутагенез или "прогулка по CDR" и повторный отбор с применением антигена-мишени или его антигенного эпитопсвязывающего фрагмента для идентификации антител, имеющих CDR, которые связываются с более высокой (или более низкой) аффинностью с антигеном по сравнению с первоначальным или исходным антителом (см., например, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Мутагенез целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов приводит к получению полуслучайного набора аминокислотных мутаций. Можно конструировать библиотеки, состоящие из пула вариантов клонов, каждый из которых отличается изменением одной аминокислоты в одном CDR и который содержит варианты, представляющие каждую возможную аминокислотную замену для каждого остатка CDR. Мутанты с повышенной (или пониженной) аффинностью связывания с антигеном можно подвергнуть скринингу путем приведения в контакт иммобилизованных мутантов с меченым антигеном. Для идентификации мутантных антител с повышенной или пониженной аффинностью к антигену можно применять любой известный из уровня техники способ скрининга (например, ELISA) (см. Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Возможно также применять "прогулку по CDR", в ходе которой легкая цепь подвергается случайному мутагенезу (см. Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

Способы осуществления такого созревания аффинности описаны, например, в Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes", *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41", *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification", *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; и Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26): 9029-9034.

Таким образом, последовательность вариантов CDR охватываемых антител или их эпитопсвязывающих фрагментов может отличаться от последовательности CDR исходного антитела, вариантов C10-2 и C10.2 благодаря заменам; например, замененным 4 аминокислотным остаткам, 3 аминокислотным остаткам, 2 аминокислотным остаткам или 1 аминокислотному остатку. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что аминокислоты в CDR-областях можно заменять посредством консервативных замен, определенных в 3 таблицах выше. Например, кислый остаток Asp можно заменить на Glu без значительного влияния на характеристики связывания антитела.

Как используется в данном документе, говорят, что антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент

"специфически" связываются с областью другой молекулы (т.е. эпитопом), если они реагируют или ассоциируют с этим эпитопом чаще, быстрее, с большей длительностью и/или с большей аффинностью или авидностью по сравнению с альтернативными эпитопами. Также при прочтении этого определения следует понимать, что, например, антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с первой мишенью, могут не связываться со второй мишенью или могут делать это не специфически или не преимущественно. Используемый в данном документе термин "связывание" применительно к связыванию антитела с предварительно определенным антигеном в типичном случае относится к связыванию с аффинностью, соответствующей KD, составляющей приблизительно 10^{-7} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, при определении с помощью, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore® 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела в качестве анализируемого вещества, и к связыванию с предварительно определенным антигеном с аффинностью, соответствующей KD, по меньшей мере в десять раз более низкой, как, например, по меньшей мере в 100 раз более низкой, например, по меньшей мере в 1000 раз более низкой, как, например, по меньшей мере в 10000 раз более низкой, например, по меньшей мере в 100000 раз более низкой, чем для его аффинности связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена, или близкородственным антигеном. Степень, на которую аффинность является более низкой, зависит от KD антитела, так что если KD антитела является очень низкой (то есть антитело является высокоспецифическим), то степень, на которую аффинность к антигену является более низкой, чем аффинность к неспецифическому антигену, может быть по меньшей мере 10000-кратной.

Термин "kd" (с-1 или 1/с), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена. Указанное значение также называют значением koff.

Термин "ka" (M-1 x с-1 или 1/M- с), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена.

Термин "KD" (M), используемый в данном документе, относится к равновесной константе диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена, получаемой путем деления kd на ka.

Термин "KA" (M-1 или 1/M), используемый в данном документе, относится к равновесной константе ассоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена, получаемой путем деления ka на kd.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу к тау-белку или его эпитопсвязывающему фрагменту, которые проявляют одно или несколько следующих свойств:

- (i) практически отсутствующей способности к связыванию с нефосфорилированным тау-белком;
- (ii) практически отсутствующей способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S404 и не фосфорилированным в S396;
- (iii) способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S396;
- (iv) способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным как в S396, так и в S404;
- (v) способности к селективному проведению различий между фосфорилированными остатками S396 и S404 тау-белка, так что они практически не способны связываться с фосфорилированным остатком 404 (pS404);
- (vi) способности к связыванию с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера;
- (vii) способности к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и/или

(viii) способности к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полосы тау-белка размером 55 кДа более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей гTg4510 или способности к специфичному уменьшению полос фосфорилированного в S396 гиперфосфорилированного тау-белка по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полос негиперфосфорилированного тау-белка более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с экстрактами головного мозга, полученными посмертно от людей с AD.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения высокоспецифичных высокоаффинных антител, где способ предусматривает стадии:

(A) проведение инъекции иммуногена млекопитающему с тем, чтобы иммунизировать указанное млекопитающее;

(B) повторение указанной иммунизации указанного млекопитающего два или более раз;

(C) скрининг образца сыворотки от указанного повторно иммунизированного млекопитающего на наличие необходимых высокоспецифичных высокоаффинных антител, но в значительно меньшей степени способных связываться с другим белком; и

(D) извлечение указанных высокоспецифичных высокоаффинных антител.

Таким образом, настоящее изобретение относится к высокоспецифичному высокоаффинному антителу к патогенному гиперфосфорилированному тау-белку, содержащему гиперфосфорилированный остаток S396. Такие антитела могут быть получены с помощью адаптации вышеуказанного способа полу-

чения высокоспецифичных высокоаффинных антител к следующему:

(А) проведение инъекции иммуногена млекопитающему, при этом указанный иммуноген предусматривает дифосфорилированный пептид, содержащий 18-40, как, например, 18-30, как, например, 20-30 последовательных аминокислотных остатков, содержащих TDHGAIEIVYK^(b)SPVVSQDT^(b)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающий остатки 386-410 тау-белка 2N4R, с тем, чтобы иммунизировать указанное млекопитающее;

(В) повторение указанной иммунизации указанного млекопитающего два или более раз;

(С) проведение скрининга образца сыворотки крови от указанного многократно иммунизированного млекопитающего в отношении наличия высокоспецифичных высокоаффинных антител, способных связываться с патогенным гиперфосфорилированным тау-белком, содержащим фосфорилированный остаток S396, но в значительно меньшей степени способных связываться с непатогенным тау-белком; и

(D) извлечение указанных высокоспецифичных высокоаффинных антител.

Как используется в данном документе, "практически отсутствующая способность" к связыванию с молекулой тау-белка означает более чем 20% различие, более чем 40% различие, более чем 60% различие, более чем 80% различие, более чем 100% различие, более чем 150% различие, более чем 2-кратное различие, более чем 4-кратное различие, более чем 5-кратное различие или более чем 10-кратное различие в функциональных характеристиках по сравнению с выявляемым связыванием, опосредованным эталонным антителом.

Термины "селективный" и "иммуноселективный", когда речь идет о способностях к связыванию, которыми обладает антитело к тау-белку в отношении двух эпитопов, подразумеваются как означающие то, что для наблюдаемого связывания в насыщающих условиях проявляется по меньшей мере 80% различие, по меньшей мере 95% различие и наиболее предпочтительно 100% различие (т. е. отсутствие выявляемого связывания с одним эпитопом). Термины "селективный" и "иммуноселективный", когда речь идет об антителе к тау-белку, дополнительно подразумеваются как означающие то, что антитело связывается с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера и способно различать патологический и непатологический человеческий тау-белок.

Термины "экстрагируемая в TBS" (S1), "экстрагируемая в высокосолевым растворе/саркозиле" (S3) и "нерастворимая в саркозиле" (P3) фракции означают фракции, получаемые с помощью биохимического фракционирования тау-белка, описанного в данном документе.

Термин "нормальный тау-белок" относится к нормальному тау-белку головного мозга, содержащему 2-3 моль фосфата на моль белка.

Термин "гиперфосфорилированный тау-белок" относится к полифосфорилированным молекулам тау-белка, соответствующим индуцированному полианионными молекулами сдвигу подвижности в вестерн-блоттинге, или к молекулам тау-белка, имеющим более пяти, шести или семи фосфорилированных сериновых, треониновых или тирозиновых сайтов.

Термин "тау-белок, имеющий фосфорилированный остаток 396" относится к гиперфосфорилированному тау-белку, в котором сериновый остаток 396 является фосфорилированным.

Термин "трансгенное животное, отличное от человека" относится к животному, отличному от человека, имеющему геном, содержащий один или несколько человеческих трансгенов или трансхромосом, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь (интегрированных или не интегрированных в природную геномную ДНК животного), которое способно экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген, кодирующий человеческую легкую цепь, и либо трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, либо трансхромосому, кодирующую человеческую тяжелую цепь, вследствие чего у мыши вырабатывается человеческое антитело к тау-белку при иммунизации антигенным тау-белком и/или клетками, экспрессирующими тау-белок. Трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае с трансгенными мышами, например, мышами HuMAb, такими как мыши HCo7 или HCo12, или трансген, кодирующий человеческую тяжелую цепь, может сохраняться внехромосомно, как в случае с трансхромосомными мышами KM, описанными в WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (в совокупности называемые в данном документе "трансгенными мышами") способны вырабатывать несколько изотипов моноклональных антител человека к данному антигену (таких как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), подвергаясь V-D-J-рекомбинации и переключению изотипа.

Трансгенное животное, отличное от человека, также можно использовать для получения антител к специфическому антигену путем введения генов, кодирующих такое специфичное антитело, например, путем формирования функциональной связи генов с геном, экспрессируемым в молоке животного.

Термин "лечение" или "осуществление лечения", используемый в данном документе, означает облегчение, замедление, ослабление или устранение прогрессирования или тяжести заболевания или нарушения или облегчение, замедление, ослабление или устранение одного или нескольких симптомов или побочных эффектов такого заболевания или нарушения. Для целей настоящего изобретения "лечение" или "осуществление лечения" дополнительно означает подход для получения полезных или желаемых клинических результатов, при этом "полезные или желаемые клинические результаты" включают без ограничения облегчение симптома, снижение степени нарушения или заболевания, стабилизированное

(т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания или нарушения, задержку или замедление прогрессирования состояния заболевания или нарушения, облегчение или смягчение состояния заболевания или нарушения и ремиссию заболевания или нарушения, либо частично, либо полностью.

"Эффективное количество", применяемое в отношении антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, относится к количеству, которое при введении в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени является достаточным для достижения намеченного биологического эффекта или желаемого терапевтического результата, в том числе без ограничения клинических результатов. Фраза "терапевтически эффективное количество", применяемая в отношении антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, подразумевается как означающая количество антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента, которое является достаточным для облегчения, смягчения, стабилизации, устранения, замедления, ослабления или задержки прогрессирования состояния нарушения или заболевания или симптома нарушения или заболевания. В варианте осуществления способ по настоящему изобретению предусматривает введение антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента в комбинациях с другими соединениями. В таком случае "эффективное количество" представляет собой количество комбинаций, достаточное для того, чтобы вызывать желаемый биологический эффект.

Терапевтически эффективное количество антитела к тау-белку или его эпитопсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также от способности антитела к тау-белку или его эпитопсвязывающего фрагмента вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или пагубные эффекты антитела или части антитела.

Как указано выше, настоящее изобретение, в частности, относится к моноклональным антителам или их эпитопсвязывающим фрагментам и к абсолютно новому способу получения таких молекул (и, следовательно, таких их эпитопсвязывающих фрагментов). Эта возможность выделять моноклональные антитела с помощью нового способа представлена в данном документе на примере его применения для выделения моноклональных антител, способных специфически связываться с фосфорилированным сериновым остатком 396 (P-S396, pS396, ^{1p}S396) человеческого тау-белка (SEQ ID NO: 1). Эти антитела дополнительно характеризуются своей способностью к проведению различий между фосфорилированными остатками серином-396 и серином-404 (P-S404, pS404), так что они не связываются с тау-белком с фосфорилированным серином-404, за исключением случаев, когда тау-белок также фосфорилирован по остатку 396.

Антитела по настоящему изобретению или их эпитопсвязывающий фрагмент были получены и выделены путем применения нового способа, который способствует отбору pS396-специфичных антител. Дополнительно, посредством применения этой весьма строгой процедуры отбора клонов антител были получены антитела, которые являются не только высокоспецифичными в отношении S396, но также и высокоселективными в отношении фосфорилированного эпитопа pS396. Эти антитела уникальным образом распознают тау-белок из головного мозга с болезнью Альцгеймера. Процедура скрининга обеспечивает идентификацию антител, обладающих функциональной и терапевтической полезностью.

Индукцировали выработку антител к дифосфорилированному пептиду TDHGAEIVYK(p)SPVVGSDT(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающему остатки 386-408 тау-белка 2N4R. Мышей иммунизировали фосфорилированным пептидом. После получения достаточных титров антител мышей умерщвляли и получали гибридомы. Гибридомы подвергали скринингу с помощью дот-блот-анализа и MSD-ELISA с иммобилизованным патологическим и непатологическим человеческим тау-белком. Способность к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком в ходе дот-блот-анализа и вестерн-блот-анализа применяли для отбора гибридом. Отбирали шестнадцать клонов, из которых извлекали четыре гибридомных клона, которые вырабатывали антитела, характеризующиеся чрезвычайно высокими способностями к связыванию с патологическим материалом человеческого тау-белка.

Специфичное связывание с патологическим и непатологическим тау-белком также определяли путем выделения тау-белка из пораженного заболеванием и не пораженного заболеванием головного мозга людей с AD и иммобилизации этого материала на планшетах для MSD-ELISA (пример 4).

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, образование которых происходит в ответ на дифосфорилированный пептид, содержащий по меньшей мере 18, как, например, по меньшей мере 20, последовательных аминокислотных остатков в пределах TDHGAEIVYK^(p)SPVVGSDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающего остатки 386-410 тау-белка 2N4R. В этом аспекте настоящего изобретения образование моноклонального антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента в типичном случае вызывается в ответ на дифосфорилированный пептид, содержащий 18-40, как, например, 18-30, как, например, 20-30, последовательных аминокислотных остатков, содержащих TDHGAEIVYK^(p)SPVVGSDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающий остатки 386-410 тау-белка 2N4R.

Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его

эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, обладающие специфичностью в отношении фосфорилированного тау-белка (pTau) от пациентов, пораженных AD, по сравнению со здоровыми контрольными субъектами в соответствующей возрастной группе, так что указанные моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент характеризуются различием в специфичности в отношении фосфорилированного тау-белка (pTau) от пациентов, пораженных AD, по сравнению с тау-белком от здоровых контрольных субъектов в соответствующей возрастной группе, представляющим собой более чем 50-кратное, как, например, более чем 100-кратное повышение специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в основном на ELISA анализе для выявления фосфорилированного тау-белка (pTau) в гомогенатах головного мозга от субъектов с AD и от здоровых контрольных субъектов с применением специфической схемы 1 ELISA или MSD для фосфорилированных и мультимерных молекул, описанной в данном документе.

Связанный аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, обладающие специфичностью в отношении тау-белка из материала, пораженного AD, так что указанные моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент характеризуются различием в специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в соответствующей возрастной группе, представляющим собой более чем 50-кратное, как, например, более чем 100-кратное повышение специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в основном на ELISA или MSD анализе для выявления фосфорилированного тау-белка (pTau) в гомогенатах головного мозга от субъектов с AD и от здоровых контрольных субъектов с применением специфической схемы 1 ELISA для фосфорилированных и мультимерных молекул.

Способ выполнения схемы 1 ELISA или MSD включает стадии А) обеспечения захвата патологических антигенных человеческих тау-белков из образцов головного мозга от субъектов с AD на планшетах, покрытых C10-2; В) инкубирования антигенных тау-белков с возрастающими концентрациями pS396-специфичных антител и С) выявления остаточного свободного антигенного тау-белка, захваченного иммобилизованным C10.2, с помощью меченых SULFO-TAG антител к человеческому (общему) тау-белку от MSD.

Более конкретно, стадия А включает покрытие планшетов MSD (в типичном случае в течение ночи при 4°C) антителом C10-2, в типичном случае при 0,5 мкг/мл (захватывающим антителом) в буфере для покрытия, блокирование (в типичном случае в течение 1 ч при комнатной температуре) и промывание, в типичном случае 3 раза. Стадия В включает смешивание образцов лизата РЗ (в типичном случае разбавленного при 1:1000 = 2-4 мкг/мл общего белка) и/или S1(p) (в типичном случае разбавленного при 1:300 = 20-40 нг/мл общего белка) из материала от субъектов с AD (объединенных от 3 пациентов) с антителом, специфичным к пептидному эпитопу pS396, в ступенчато изменяющихся концентрациях и инкубирование (в типичном случае в течение 1 ч при комнатной температуре). Реакционные смеси затем инкубируют в течение 2 ч в планшетах, подготовленных на стадии А. Стадия С включает выявление тау-белка, захваченного C10-2, с помощью меченного SULFO-TAG антитела к человеческому тау-белку (в типичном случае при 1:50) от MSD согласно инструкциям производителя. Планшеты анализируют на SECTOR® S600 от MSD. РЗ из материала от субъектов с AD и S1(p) из материала от субъектов с AD тестируют согласно аналогичной схеме.

Дополнительный вариант осуществления направлен на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с фосфорилированным сериновым остатком 396 человеческого тау-белка (SEQ ID NO: 1), которые были получены или произведены в линии клеток, такой как линия человеческих клеток, линия клеток млекопитающего, отличного от человека, линия клеток насекомого, дрожжей или бактерии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с фосфорилированным остатком 396 человеческого тау-белка (SEQ ID NO: 1), получают в линии клеток CHO, линии клеток HEK, линии клеток ВНК-21, линии мышинных клеток (такой как линия клеток миеломы), линии клеток фибросаркомы, линии клеток PER.C6, линии клеток НКВ-11, линии клеток CAP и линии человеческих клеток HuH-7.

Характеристики специфичной аффинности и свойств связывания вариантов C10-2 и C10.2 получали с применением пептидов 386-410 тау-белка (2R4N), фосфорилированных либо не фосфорилированных в положении 396 или 404. Путем применения протокола специфичной иммунизации и скрининга, вкратце изложенного в настоящей заявке, получают высокоспецифичные в отношении фосфосерина-396 (pS396) антитела.

Для демонстрации того, что антитела являются специфичными в отношении патологического тау-белка, также получали характеристики антител C10-2 с помощью иммуногистохимического анализа. Антитела проявляют высокоспецифичное связывание с нейрофибриллярными клубками в образцах головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера (клубки тау-белка) и в срезах от трансгенных по тау-белку мышей Tg4510, экспрессирующих человеческий (P301L) мутантный тау-белок. Связывание с тканью из контрольных образцов головного мозга людей и из образцов головного мозга нетрансгенных мышей не наблюдается, что демонстрирует то, что антитела специфически связываются с человеческим

тау-белком, и в частности, с тау-белком, ассоциированным с альцгеймеровской патологией.

Антитело C10-2

Один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

Альтернативно определенный, используя определение согласно IMGT, один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

Альтернативно определенный, используя определение согласно Chotia, один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54.

Показана уникальная способность антител по настоящему изобретению к распознаванию тау-белка, ассоциированного с характерной для заболевания патологией. Сравнивали связывание патологического и непатологического тау-белка. Сравнение проводят в отношении пяти опубликованных антител к тау-белку: hACI-2B6, IPN002, HJ8.5, 2.10.3 и 4E4. Антитело 2.10.3 является коммерчески доступным рекомбинантным моноклональным антителом, которое специфически связывается с тау-белком, фосфорилированным по серину-422 (pS422). HJ8.5 является коммерчески доступным моноклональным антителом, которое распознает N-концевую область только человеческого тау-белка (эпитоп, соответствующий аминокислотным остаткам 25-30). Антитело относится к изотипу IgG2b. Терапевтическое антитело к тау-белку NI-105-4E4 является коммерчески доступным антителом. В таблице показано, что выделенные антитела проявляют исключительно высокую степень специфичности и селективности в отношении человеческого патологического тау-белка. Эта селективность превосходит селективность любого из сравниваемых антител, показанных в табл. 5.

Таблица 5		
Тестируемое mAb	AD/контроль	TG/wt
hACI-2B6	3	1
IPN002	3	37
HJ8.5	3	51
4E4	отсутствие связывания	1
2.10.3	5	2
Антитело C10-2	>100	118

При насыщении антитело C10-2 проявляет более чем 100-кратную селективность в отношении P3 тау-белка, выделенной из образцов головного мозга людей с AD.

Для демонстрации того, что отобранные антитела обладают функциональной и терапевтической полезностью, антитела тестировали в анализах агрегации тау-белка *in vitro* и в клетке (пример 8). Эти анализы представляют собой функциональные анализы, в которых демонстрируется, что антитела спо-

способны препятствовать процессу патологической агрегации тау-белка. Клетки HEK293 транзигентно трансфицируют человеческим тау-белком P301L-FLAG (4R0N). Затем клетки подвергают воздействию экстрактов, содержащих тау-белок, из образцов головного мозга людей с AD или из образцов головного мозга трансгенных Tg4510. Это воздействие патологического тау-белка способствует поглощению тау-белка клетками и его внутриклеточной агрегации. Как иммуноистощение препаратов тау-белка с помощью антитела C10-2, так и непосредственная обработка клеток этими антителами способны обеспечить существенное уменьшение образования агрегатов тау-белка.

Терапевтическую полезность антитела C10-2 также оценивали у мышей, экспрессирующих человеческий тау-белок/PS1. Эта мышьяная модель является более подходящей животной моделью заболевания AD, в которой патология AD образуется лишь в позднем возрасте (в возрасте 12-18 месяцев). Тем не менее, у мышей проявляется гиперфосфорилирование тау-белка до появления патологии плотных клубков. Мышам инъецировали дозу 15 мг/кг два раза в неделю в течение длительного периода 13 недель. У мышей, обработанных антителом, проявляется существенное уменьшение уровня фосфорилированного тау-белка, что указывает на то, что при длительной обработке с помощью C10-2 будет уменьшаться патология клубков и, таким образом, последующая нейродегенерация *in vivo*.

Антитела по настоящему изобретению специфично удаляют гиперфосфорилированный тау-белок из экстрактов головного мозга мышей Tg4510 с помощью способов иммуноистощения. Кроме того, антитела по настоящему изобретению не удаляют нормальный тау-белок из гомогенатов, тогда как коммерчески доступное антитело Tau5 удаляет. В отличие от коммерческих антител, связывающихся с тау-белками, в которых имеет место фосфорилирование по остатку 404 или как по остатку 404, так и по остатку 396, антитела по настоящему изобретению специфично удаляют на 95% гиперфосфорилированный тау-белок, который фосфорилирован по серину-396. Эксперименты (пример 12) демонстрируют, что несмотря на то, что антитело по настоящему изобретению удаляет лишь очень небольшую долю общего тау-белка в гомогенате головного мозга (8%), антитела, тем не менее, специфично удаляют гиперфосфорилированный тау-белок (на 90%). Соответственно один аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с патогенным гиперфосфорилированным тау-белком. Дополнительно в экспериментах, в которых гиперфосфорилированный тау-белок удаляли с помощью антитела по настоящему изобретению, активность затравочного действия устраняется. При удалении гиперфосфорилированного тау-белка из гомогенатов гомогенаты больше не индуцируют затравочное действие с формированием патологии тау-белка. Было выдвинуто предположение, что при уменьшении затравочного действия уменьшается развитие образования клубков и прогрессирование таупатий, в том числе болезни Альцгеймера. Соответственно дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на антитело по настоящему изобретению для применения в уменьшении прогрессирования AD или интенсивности симптомов AD.

Антитело D55E

Один аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55E. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55E, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12;
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55E, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Антитело D55Q

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55Q. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий

фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на анти-тело D55Q, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55Q, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Антитело D55S

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55S. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на анти-тело D55S, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55S, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Исследования с применением антитела D55S, антитела D55Q, антитела D55E указывают на то, что мутация этого остатка приводит к образованию антитела с неизменными свойствами связывания по сравнению с указанными антителами до и после обработки при низком значении pH в течение длительного периода времени при комнатной температуре, что указывает на то, что изомеризация отсутствует при низком значении pH или что любой изомеризованный белок имеет неизменные свойства связывания по сравнению с предварительной обработкой.

Антитело N32S

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32S. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на анти-тело N32S, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

(a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; и

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Альтернативным определением антитела N32S, используя определение согласно IMGT, является моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

Дополнительным альтернативным определением антитела N32S, используя определение согласно Chotia, является моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54.

Как можно увидеть из фиг. 1, IC_{50} антитела N32S (черные кружки) является уменьшенной по сравнению с антителом C10-2: рассчитано, что IC_{50} N32S составляет 44 нМ. Это заметное улучшение по сравнению с C10-2 не было ожидаемым. Как подтверждается фиг. 1, один аспект настоящего изобретения направлен на антитело, которое ингибирует P3 из материала от субъектов с AD в жидкофазном анализе ингибирования, описанном в данном документе, таким образом, что сигнал уменьшается на 50% при концентрации антитела, составляющей 100 нМ или меньше. В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению характеризуется IC_{50} , составляющей от 0,1 нМ до 100 нМ, как, например, концентрацией 50 нМ или меньше, как, например, от 0,1 нМ до 50 нМ, исходя из жидкофазного анализа ингибирования захвата антигенов P3 из материала от субъектов с AD.

Данные, полученные при применении антитела N32S, указывают, что мутация в положении 32 легкой цепи антитела C10-2 или CDR1 LC антитела C10-2 по типу замены на серии приводит к повышенной кажущейся аффинности (IC_{50}) в анализах ингибирования пептида. Кроме того, мутация в положении 32 по типу замены на серии или глутамин (антитело N32S и антитело N32Q) устраняет дезамидирование как в положении 32, так и 34, как показано на фиг. 20. Специфическая активность, определенная в рамках исследований затравочного действия и агрегации *in vitro*, сохраняется как в варианте N32S, так и N32Q.

Возможность потенциального дезамидирования идентифицировали в C10-2 в положении, которое может привести к неоднородности партий белков. C10-2 характеризовались неоднородным связыванием с антигенами P3 из материала от субъектов с AD, при этом незначительная доля с высокой кажущейся аффинностью (2-5 нМ) и преобладающим связыванием с низкой кажущейся аффинностью (200-1000 нМ) (фиг. 1). Неоднородное связывание может отражать различные субпопуляции дезамидированных и недезамидированных C10-2. Вариант получали с помощью замены (N32S), которая предотвращала дезамидирование. Показано улучшенное связывание по активности, как указано в целом по сниженной IC_{50} (более высокой кажущейся аффинности) по сравнению с C10-2. Вводили дополнительную замену A101T, приводящую к однородному связыванию по типу, характеризующемуся высокой кажущейся аффинностью. Улучшенная активность связывания как у N32S, так и у N32S-A101T свидетельствует о том, что с помощью вышеописанных мутаций получают более стабильные и однородные антитела.

Антитело N32Q

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32Q. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на анти-тело N32Q, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32Q, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Как указано, данные, полученные при применении антитела N32S, указывают, что мутация в положении 32 легкой цепи антитела C10-2 или CDR1 LC антитела C10-2 по типу замены на серин приводит к повышенной кажущейся аффинности (IC_{50}), при этом мутация по типу замены на глутамин (антитело N32Q) приводит к неизменной активности связывания. Однако мутация в положении 32 по типу замены на серин или глутамин (антитело N32S и антитело N32Q) устраняет дезамидирование как в положении 32, так и 34, как показано на фиг. 20. Соответственно как антитело N32S, так и антитело N32Q обладают преимуществами.

Специфическая активность, определенная в рамках исследований затравочного действия и агрегации *in vitro*, сохраняется как в варианте N32S, так и N32Q.

Антитело N34S

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N34S. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклиальное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на анти-тело N34S, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N34S, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Антитело N34Q

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N34Q. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклиальное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

- Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N34Q, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- ### Антитело N32S,N34S

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32S, N34S. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, N34S, относится к моноклональному антителу или его эпитоп-связывающему фрагменту, содержащим:

- Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, N34S, относится к моноклональному антителу или его эпитоп-связывающему фрагменту, содержащим:

- ### Антитело N32Q, N34S

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32Q, N34S. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32Q, N34S, относится к моноклональному антителу или его эпитоп-связывающему фрагменту, содержащим:

- Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32Q, N34S, относится к моноклиальному антителу или его эпитоп-связывающему фрагменту, содержащим:

- 28 -

- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Данные, полученные при применении антитела A101T, указывают на то, что мутация тяжелой цепи антитела C10-2 или CR3 тяжелой цепи антитела C10-2 приводит к двукратному повышению связывания пептида и 10-20-кратному повышению связывания с материалом РЗ. Дополнительно варианты, содержащие мутацию A101T, характеризуются повышенной специфической активностью в анализах затравочного действия *in vitro*.

Антитело N32S, A101T

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32S, A101T. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16;
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39;
- и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Используя определение согласно IMGT, антитело N32S, A101T представляет собой моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 49;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

Используя определение согласно Chotia, антитело N32S, A101T представляет собой моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.

Как можно увидеть из фиг. 1, IC₅₀ антитела N32S, A101T (белые кружки) является существенно уменьшенной по сравнению с антителом C10-2: рассчитано, что IC₅₀ N32S, A101T составляет 14 нМ. Это заметное улучшение по сравнению с C10-2 не было ожидаемым. Исходя из фиг. 1, один аспект настоящего изобретения направлен на антитело, которое ингибирует РЗ из материала от субъектов с АД в жидкофазном анализе ингибирования, описанном в данном документе, таким образом, что сигнал уменьшается на 50% при концентрации, составляющей 100 нМ антитела или меньше, как, например, от 10 до 100 нМ антитела, как, например, при концентрации, составляющей 50 нМ или меньше, как, например, от 10 до 50 нМ антитела. Как показано на фиг. 20, антитело N32S, A101T является очень стабильным в отношении дезамидирования. Как показано на фиг. 19, антитело N32S, A101T характеризовалось более выраженным уменьшением агрегации.

Антитело N32Q, A101T

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32Q, A101T. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32Q, A101T, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32Q, A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39; и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Антитело N32S, D55E

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу N32S, D55E. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, D55E, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16;
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело N32S, D55E, относится к моноклиальному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31; и
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39; и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
(c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
и дополнительно содержащим по меньшей мере одно из
(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55E, A101T. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и
(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
(b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
(c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
и дополнительно содержащим
(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и
(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55Q, A101T. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; и
(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

- 33 -

связывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Антитело D55S, A101T

Другой аспект настоящего изобретения относится к варианту антитела C10-2, антителу D55S, A101T. Этот аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55S, A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим:

- (a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; и
- (b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

Альтернативно определенный дополнительный вариант осуществления аспекта настоящего изобретения, направленного на антитело D55S, A101T, относится к моноклональному антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту, содержащим по меньшей мере одно из:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;
 - (b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
 - (c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- и дополнительно содержащим
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
 - (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; и
 - (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Предполагаются комбинации вариантов тяжелых цепей и вариантов легких цепей, как, например, предполагаются множество вариантов в пределах легкой цепи и/или множество вариантов в пределах тяжелой цепи, комбинация одного варианта в пределах легкой цепи с одним или множеством вариантов в пределах тяжелой цепи, комбинации множества вариантов в пределах легкой цепи с множеством вариантов в пределах тяжелой цепи. Антитело по настоящему изобретению предпочтительно содержит легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из

- SEQ ID NO: 12 (легкая цепь C10-2);
 - SEQ ID NO: 16 (вариант N32S легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 17 (вариант N32Q легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 18 (вариант N34S легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 19 (вариант N34Q легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 20 (вариант N32S, N34S легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 21 (вариант N32Q, N34S легкой цепи);
 - SEQ ID NO: 22 (вариант N32Q, N34Q легкой цепи) и
 - SEQ ID NO: 23 (вариант N32S, N34Q легкой цепи); и
- тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из
- SEQ ID NO: 11 (тяжелая цепь C10-2);
 - SEQ ID NO: 13 (вариант D55E тяжелой цепи);
 - SEQ ID NO: 14 (вариант D55Q тяжелой цепи);
 - SEQ ID NO: 15 (вариант D55S тяжелой цепи);
 - SEQ ID NO: 24 (вариант A101T тяжелой цепи);
 - SEQ ID NO: 25 (вариант D55E, A101T тяжелой цепи);
 - SEQ ID NO: 26 (вариант D55Q, A101T тяжелой цепи) и
 - SEQ ID NO: 27 (вариант D55S, A101T тяжелой цепи).

В одном варианте осуществления легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 12, тяжелая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 (вариант D55E тяжелой цепи); SEQ ID NO: 14 (вариант D55Q тяжелой цепи); SEQ ID NO: 15 (вариант D55S тяжелой цепи); SEQ ID NO: 24 (вариант A101T тяжелой цепи); SEQ ID NO: 25 (вариант D55E, A101T тяжелой цепи); SEQ ID NO: 26 (вариант D55Q, A101T тяжелой цепи) и SEQ ID NO: 27 (вариант D55S, A101T тяжелой цепи). В альтернативном варианте

осуществления в случае, если тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11, то легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 (вариант N32S легкой цепи); SEQ ID NO: 17 (вариант N32Q легкой цепи); SEQ ID NO: 18 (вариант N34S легкой цепи); SEQ ID NO: 19 (вариант N34Q легкой цепи); SEQ ID NO: 20 (вариант N32S, N34S легкой цепи); SEQ ID NO: 21 (вариант N32Q, N34S легкой цепи); SEQ ID NO: 22 (вариант N32Q, N34Q легкой цепи) и SEQ ID NO: 23 (вариант N32S, N34Q легкой цепи).

Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент соответственно содержат:

(a) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38;

(b) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(c) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

(d) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;

(e) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 39.

Представляющие интерес варианты осуществления комбинаций вариантов включают такие, где антитела выбраны из группы, состоящей из антитела N32S, A101T; антитела N32Q, A101T; антитела N32S, D55E и антитела N32Q, D55E, предпочтительно антитела N32S, A101T. Как можно увидеть из примеров, антитело N32S и антитело N32S, A101T являются предпочтительным вариантом осуществления.

В совокупности примеры показывают, что антитела по настоящему изобретению, в том числе C10-2, эффективно связываются с планшетами MSD, покрытыми антигенами P3 из материала от субъектов с AD. Для сравнения, коммерческие антитела, такие как PHF-13, обладают низкой активностью связывания. Дополнительно, PHF-13 демонстрировало значительно более высокую степень неспецифического связывания по сравнению с антителами по настоящему изобретению. Жидкофазное ингибирование C10-2 захвата антигена Ptau в планшете, покрытом C10-2, является эффективным ($IC_{50} = 10-20$ нМ), тогда как в случае с PHF-13 оно является неэффективным ($IC_{50} = 500-1000$ нМ).

Один аспект настоящего изобретения направлен на антитело, содержащее:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и

(d) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

Один аспект настоящего изобретения направлен на антитело, содержащее:

(a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;

(b) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7;

(c) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; и

(d) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23.

Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению в типичном случае ингибирует P3 из материала от субъектов с AD в жидкофазном анализе ингибирования таким образом, что сигнал уменьшается на 50% при концентрации, составляющей 100 нМ антитела или меньше, как, например, от 10 до 100 нМ антитела, как, например, от 50 нМ или меньше, как, например, от 10 до 50 нМ антитела. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению в типичном случае способны удалять по меньшей мере 15% тау-белка, фосфорилированного по серину-396, из гомогенатов головного мозга от субъектов с AD при содержании антитела, составляющем приблизительно 75 нг, что определяют согласно сигналу тау-белка pS396 в вестерн-блоттинге после исследований по иммуноистощению экстрактов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера.

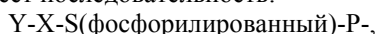
Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент предпочтительно представляют собой человеческое или гуманизированное антитело.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты, упомянутые выше, согласно одному варианту осуществления могут дополнительно содержать вариант таких CDR1, CDR2 или CDR3 легкой и/или тяжелой цепи (не более чем с 4 отличиями в аминокислотах, или не более чем с 3 отличиями в аминокислотах, или не более чем с 2 отличиями в аминокислотах, или не более чем с 1 отличием в аминокислотах).

Как можно увидеть из фиг. 18, CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC и CDR3 LC по меньшей мере в одном варианте осуществления важны для связывания с областью 392-398 тау-белка. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающий фрагмент содержат: В одном аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение направлено на антитело или его эпитопсвязывающие фрагменты, образующие гидрофобный карман, образуемый L3:H3, L3:F8*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 с Y394 пептида тау-белка. В варианте осуществления настоящего изобретения направлено на антитело, которое конкурирует с антителом, дополнительно описанным в

данном документе, за образование сети водородных связей между сольватированным ^{125}I S396 и L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3; (*) L3:F8 представляет собой С-концевой остаток каркасной области, фланкирующий CDR L3 (см. фиг. 11).

Как можно увидеть из кристаллической структуры, определенной с помощью рентгенографического анализа, антитело по настоящему изобретению связывается на двух уровнях селективности. Первый уровень селективности представляет собой селективность в отношении гиперфосфорилированного патологического тау-белка, а второй уровень селективности представляет собой селективность в отношении фосфорилированного серинового остатка, где фосфат указанного фосфорилированного серина связан водородной связью с боковой цепью тирозинового остатка, отдаленного на один остаток от указанного фосфорилированного серина. Соответственно, представляющий интерес аспект настоящего изобретения направлен на моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, селективные в отношении аминокислотного мотива гиперфосфорилированного тау-белка, при этом мотив состоит из фосфорилированного серинового остатка и тирозинового остатка, расположенных через один остаток. В типичном случае аминокислотный мотив имеет последовательность:



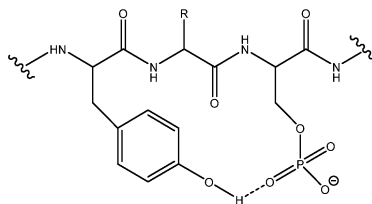
где Y представляет собой тирозин,

X представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту,

P представляет собой пролин, и

S (фосфорилированный) представляет собой серин с фосфорилированной гидроксильной группой боковой цепи.

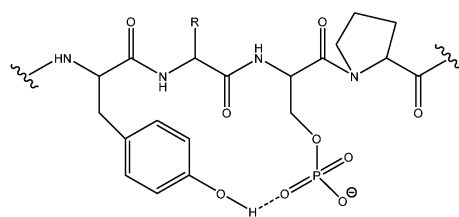
Подобным образом, представляющий интерес аспект настоящего изобретения направлен на антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которые связываются с фосфорилированным тау-белком, предпочтительно с гиперфосфорилированным тау-белком, где указанные антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении мотива IA из аминокислотных остатков, где R представляет собой боковую цепь встречающейся в природе аминокислоты.



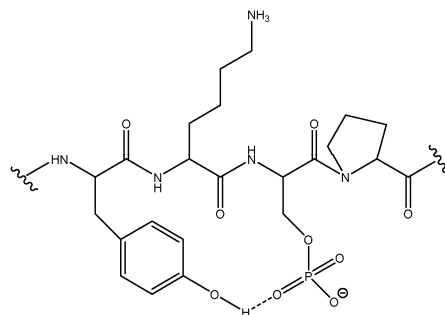
IA

Без ограничения какой-либо конкретной теорией полагают, что антитело по настоящему изобретению является селективным в отношении аминокислотного мотива IA, где указанный мотив имеет конформацию, которую принимает патологический тау-белок. Соответственно аминокислотный мотив IA в типичном случае представляет собой последовательность, селективно распознаваемую антителом по настоящему изобретению. Соответственно представляющий интерес аспект настоящего изобретения направлен на антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которые связываются с фосфорилированным тау-белком, предпочтительно с гиперфосфорилированным тау-белком, где указанные антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении мотива IA из аминокислотных остатков, где R представляет собой боковую цепь встречающейся в природе аминокислоты.

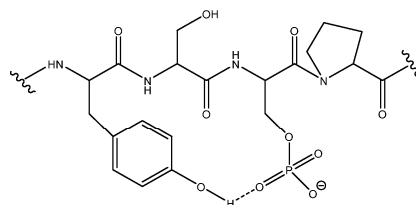
В типичном варианте осуществления данного аспекта настоящего изобретения настоящее изобретение направлено на антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которые связываются с фосфорилированным тау-белком, предпочтительно с гиперфосфорилированным тау-белком, где указанные антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении мотива IB из аминокислотных остатков, где R представляет собой боковую цепь встречающейся в природе аминокислоты, как, например, без ограничения IC или ID.



IB



IC



ID

В одном аспекте настоящего изобретения CDR1-область HC антитела по настоящему изобретению, Asp-Arg-Thr-Ile-His (SEQ ID NO: 7) взаимодействует с мотивами IA-ID гиперфосфорилированного тау-белка.

Как можно увидеть из фиг. 18, в данном аспекте настоящего изобретения наличие двух последовательных заряженных остатков, а именно аспарагиновой кислоты и аргинина в CDR1 HC играет роль в соединении посредством водородной связи с мотивом в целевом эпитопе тау-белка, где антитело является селективным в отношении аминокислотного мотива гиперфосфорилированного тау-белка, при этом мотив состоит из фосфорилированного серинового остатка и тирозинового остатка, расположенных через один остаток. Соответственно один аспект настоящего изобретения направлен на антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которые связываются с фосфорилированным тау-белком, предпочтительно с гиперфосфорилированным тау-белком, где указанные антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении мотива IA-ID из аминокислотных остатков, где антитело содержит CDR1-область HC, которая содержит два последовательных заряженных аминокислотных остатка, такие как аспарагиновая кислота и аргинин. В дополнительном альтернативном варианте данного аспекта настоящего изобретения антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с гиперфосфорилированным тау-белком, где указанные антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении эпитопа, содержащего серин-396 и тирозин-394, где между группой PO₄ и одним из указанных серина-396 и тирозина-394 образуется ковалентная связь, и между группой PO₄ и другим из серина-396 и тирозина-394 образуется водородная связь, где антитело содержит CDR1-область HC, содержащую два последовательных заряженных остатка, такие как аспарагиновая кислота и аргинин. Заряженные аминокислотные остатки CDR1-области HC могут быть выбраны из группы, состоящей из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, где по меньшей мере один из указанных остатков представляет собой аспарагиновую кислоту или аргинин, где предпочтительно один заряженный остаток представляет собой аргинин, а другой представляет собой аспарагиновую кислоту.

В дополнительном варианте осуществления данного аспекта настоящего изобретения один или оба из двух последовательных заряженных аминокислотных остатков фланкированы полярным аминокислотным остатком, предпочтительно выбранным из треонина и тирозина. Дополнительно один или оба из одного или обоих из двух последовательных заряженных аминокислотных остатков фланкированы мотивом из 3 аминокислотных остатков, представляющих собой полярный остаток-гидрофобный остаток-полярный остаток.

В одном варианте осуществления CDR1 HC содержит мотив из 5 остатков Полярная аминокислота -

Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота - Заряженная аминокислота, где по меньшей мере один из указанных остатков представляет собой аспарагиновую кислоту или аргинин, где предпочтительно один заряженный остаток представляет собой аргинин, а другой представляет собой аспарагиновую кислоту. Предпочтительно мотив из 5 остатков представляет собой мотив Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Asp-Arg. Более предпочтительно мотив из 5 остатков CDR1 HC характеризуется последовательностью Thr-Phe-Thr-Asp-Arg.

Интересно отметить, что CDR1 HC антитела по настоящему изобретению содержит мотив Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота по обе стороны от двух последовательных заряженных аминокислотных остатков, вовлеченных в образование водородной связи с фосфатной группой, вовлеченной в электростатическое взаимодействие между S396 и Y394. Соответственно в предпочтительном варианте осуществления CDR1 HC по настоящему изобретению содержит палиндромный мотив из 8 остатков Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота - Заряженная аминокислота - Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота. Предпочтительно мотив из 8 остатков CDR1 HC предусматривает мотив Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота. Более предпочтительно мотив из 8 остатков CDR1 HC предусматривает мотив Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-Thr-Ile-His.

В одном варианте осуществления антитело распознает эпитоп в пределах остатков 392-398 гиперфосфорилированного тау-белка, содержащий серин-396 и тирозин-394, где серин-396 является фосфорилированным и где антитело содержит CDR1-область HC, содержащую два последовательных заряженных аминокислотных остатка. В предпочтительном варианте осуществления антитело распознает эпитоп в пределах остатков 392-398 гиперфосфорилированного тау-белка, содержащий серин-396 и тирозин-394, где серин-396 является фосфорилированным и где антитело содержит CDR1-область HC, содержащую мотив из 5 остатков Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота - Заряженная аминокислота. В предпочтительном варианте осуществления антитело распознает эпитоп в пределах остатков 392-398 гиперфосфорилированного тау-белка, содержащий серин-396 и тирозин-394, где серин-396 является фосфорилированным и где антитело содержит CDR1-область HC, содержащую мотив Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота - Заряженная аминокислота - Заряженная аминокислота - Полярная аминокислота - Гидрофобная аминокислота - Полярная аминокислота.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит CDR1-область HC, определенную в данном документе, и CDR3-область HC, содержащую мотив из 6 остатков, содержащий по меньшей мере два заряженных остатка.

Настоящее изобретение также предусматривает способ уменьшения образования клубков тау-белка у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающих фрагментов.

Один аспект настоящего изобретения направлен на способ лечения таупатии с применением антитела по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающих фрагментов. В типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности, психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингиоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза. В более типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD) и болезни Пика. В частности, таупатии могут быть выбраны из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви.

Соответственно дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на антитело по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающие фрагменты для применения в лечении таупатии. В типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерно-

го паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза. В более типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD) и болезни Пика. В частности, таупатии могут быть выбраны из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви.

Один аспект настоящего изобретения направлен на терапию, предусматривающую введение

- i) антитела к тау-белку и
- ii) соединения, выбранного из группы, состоящей из
 - a) ингибитора BACE;
 - b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
 - c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
 - d) антагонистов NMDA-рецептора;
 - e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка;
 - f) ингибитора ацетилхолинэстеразы;
 - g) противосудорожного средства;
 - h) противовоспалительного лекарственного средства и
 - i) SSRI.

Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на композицию, содержащую

- i) антитело к тау-белку и
- ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из
 - a) ингибитора BACE;
 - b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
 - c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
 - d) антагонистов NMDA-рецептора;
 - e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка;
 - f) дополнительной ацетилхолинэстеразы;
 - g) противосудорожного средства;
 - h) противовоспалительного лекарственного средства и
 - i) SSRI.

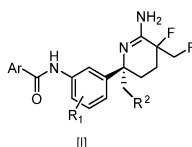
Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на набор, содержащий

- i) композицию, содержащую антитело к тау-белку и
- ii) композицию, содержащую соединение, выбранное из группы, состоящей из
 - a) ингибитора BACE;
 - b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
 - c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
 - d) антагонистов NMDA-рецептора;
 - e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка; f) ингибитора ацетилхолинэстеразы;
 - g) противосудорожного средства;
 - h) противовоспалительного лекарственного средства и
 - i) антидепрессанта.

a) Антитело к тау-белку, комбинированное с ингибитором BACE 1

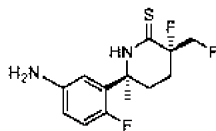
В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с ингибитором BACE 1. Ингибитор BACE1 может представлять собой низкомолекулярный ингибитор BACE I, такой как LY2886721, MK-8931, AZD3293 или E2609.

В дополнительном варианте осуществления ингибитор BACE 1 представлен формулой I

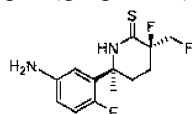


где Ar выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиазинила, имидазолила, пиразолила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, и при этом Ar необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; и R₁ представляет собой одно или несколько из водорода, галогена, C₁-C₃фторалкила или C₁-C₃алкила; и R₂ представляет собой водород или фтор.

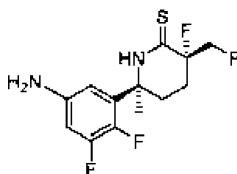
Иллюстративные соединения формулы I включают



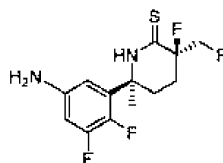
(3S,6S)-6-(5-аминно-2-фторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тион



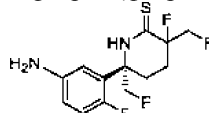
(3R,6S)-6-(5-амино-2-фторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тион



(3S,6S)-6-(5-амино-2,3-дифторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тион

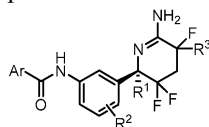


(5R,6S)-6-(5-амино-2,3-дифторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тион



(6S)-6-(5-амино-2-фторфенил)-3-фтор-3,6-бис(фторметил)пиперидин-2-тион

Дополнительно подходящий ингибитор BACE 1 может быть представлен формулой II

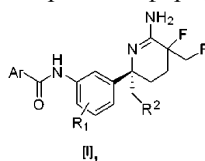


Формула II,

где Ar выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиазинила, имидазолила, пиразолила, 1,2,4-триазолила, тиофенила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, 1,3,4-тиадиазолила, изо-тиадиолила, 1,3,4-оксадиазолила, 1,2,4-оксадиазолила, фуразанила и 1,2,4-тиадиазолила, и где Ar необязательно замещен одним или несколькими из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; R¹ представляет собой C₁-C₃алкил или C₁-C₃фторалкил; R² представляет собой водород, галоген, C₁-C₃фторалкил или C₁-C₃алкил; и R³ представляет собой C₁-C₃алкил.

Иллюстративные соединения, являющиеся ингибитором BACE 1, формулы II включают соединения, выбранные из группы, состоящей из N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиперидин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамида; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиперидин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиазин-2-карбоксамида; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиперидин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамида; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиперидин-2-ил)-4-фторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамида и N-(3-((2R,5R)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиперидин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(дифторметил)пиазин-2-карбоксамида.

Другие ингибиторы VASE могут быть выбраны из формулы, приведенной ниже:



где Ar выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиразинила, имидазолила, пиразолила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, и при этом Ar необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; и

R¹ представляет собой одно или несколько из водорода, галогена, C₁-C₃фторалкила или C₁-C₃алкила;

R² представляет собой водород или фтор, или соответствующих ей фармацевтически приемлемых солей.

Например, соединения, такие как

N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-

4-фторфенил)-5-метоксипиколинамид;

N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-*d*3)пиколинамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-хлорпиколинамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиразин-2-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-бром-1-метил-1*H*-имидазол-2-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-метилтиазол-2-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-(дифторметил)оксазол-4-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-1-(дифторметил)-1*H*-пиразол-3-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(дифторметил)пиразин-2-карбоксамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-хлорбензамид;
N-(3-((2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамид;
N-(3-((2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамид;
N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-фторпиридин-2-карбоксамид;
N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-метоксипиридин-2-карбоксамид;
N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-метоксипиразин-2-карбоксамид;
N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-фторпиридин-2-карбоксамид;
N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-метоксипиридин-2-карбоксамид;

N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-5-(фторметил)-2-метил-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4,5-дифторфенил]-5-метоксипиразин-2-карбоксамид;

N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-фторпиридин-2-карбоксамид;

N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-метоксипиридин-2-карбоксамид;

N-[3-[(2*S*,5*S*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-метоксипиразин-2-карбоксамид;

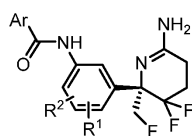
N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-фторпиридин-2-карбоксамид;

N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-метоксипиридин-2-карбоксамид и

N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-амино-5-фтор-2,5-бис(фторметил)-3,4-дигидропиридин-2-ил]-4-фторфенил]-5-метоксипиразин-2-карбоксамид;

или фармацевтически приемлемая соль указанных соединений.

Другие ингибиторы BACE могут быть представлены формулой, приведенной ниже:



Формула I.

где Ag выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиразинила, имидазолила, пиразолила, оксазолила, тиазолила и изоксазолила, и при этом Ag необязательно замещен одним или несколькими из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; и

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, C₁-C₃фторалкил или C₁-C₃алкил; или соответствующей ей фармацевтически приемлемой солью.

Например, соединения, такие как

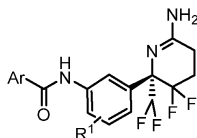
(*S*)-*N*-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-хлорпиколинамид,

(*S*)-*N*-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамид,

(S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипразин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-1-(дифторметил)-1H-пирозол-3-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-(дифторметил)оксазол-4-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-цианопиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиримидин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(дифторметил)празин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-метоксипразин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-фторпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-хлорпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-цианопиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-метоксипиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид, (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-бромпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-3,3-дифтор-2-(фторметил)-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-бромпиколинамид;

или фармацевтически приемлемая соль указанных соединений.

Другие соединения ВАСЕ могут быть представлены формулой, приведенной ниже



Формула I,

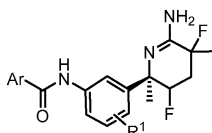
где Ar выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиазинила, имидазолила, пиазолила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, и при этом Ar необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; и

R¹ представляет собой водород, галоген, C₁-C₃фторалкил или C₁-C₃алкил; или соответствующей ей фармацевтически приемлемой солью.

Соединения могут представлять собой

(S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-хлорпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипирозин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(диформетил)пирозин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-цианопиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-метилтиазол-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиримидин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метокси-3-метилпирозин-2-карбоксамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-бромпиколинамид,
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид и
 (S)-N-(3-(6-амино-2-(диформетил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пирозин-2-карбоксамид

или фармацевтически приемлемые соли указанных соединений. Другие ингибиторы ВАСЕ могут быть представлены формулой, приведенной ниже:



где Ar выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиразинила, имидазолила, пирозолила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, и при этом Ar необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси; и

R¹ представляет собой одно или несколько из водорода, галогена, C₁-C₃фторалкила или C₁-C₃алкила;

или соответствующей ей фармацевтически приемлемой солью.

Соединение может представлять собой

N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипирозин-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипирозин-2-карбоксамид,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-хлорпиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-1-метил-1H-имидазол-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(трифторметил)пиразин-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-метилтиазол-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-2-(дифторметил)оксазол-4-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-1-(дифторметил)-1H-пиразол-3-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(дифторметил)пиразин-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-4-хлорбензамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-цианопиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5R)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиразин-2-карбоксамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4,5-дифторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 N-(3-((2R,3R,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(метокси-d3)пиколинамид,
 N-(3-((2R,3S,5S)-6-амино-3,5-дифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-бромпиколинамид

или фармацевтически приемлемые соли указанных соединений.

б) Антитело к тау-белку, комбинированное с антителом к N3PGLU-A-BETA

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с антителом к N3PGLU-A-BETA.

с) Антитело к тау-белку, комбинированное с соединением, применимым в активной или пассивной иммунотерапии в отношении Aβ-пептида

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с соединением, применимым в активной или пассивной иммунотерапии в отношении Aβ-пептида.

д) Антитело к тау-белку, комбинированное с антагонистом NMDA-рецептора

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с антагонистами NMDA-рецептора. Антагонист NMDA-рецептора может быть выбран из группы, состоящей из мемантина, наменды, намзарики (мемантин/донепезил) и их генерических форм. Антагонист NMDA-рецептора может быть выбран из антипсихотического средства. Пресинаптические

нейроны препятствуют избыточному высвобождению глутамата посредством механизмов отрицательной обратной связи, однако такие механизмы нарушаются в условиях клеточного стресса, таких как при AD. Избыток глутамата в синаптической щели вызывает постоянное открытие кальциевых каналов, приводя к повышенным уровням внутриклеточного кальция в нейронах, что вызывает тяжелое повреждение и/или гибель нейронов. Путем антагонизации NMDA-рецептора в условиях избыточного притока кальция антипсихотическое средство уменьшает избыточное поступление кальция в нейроны, что уменьшает клеточную гибель и улучшает нормальную передачу сигнала в нейронах и, тем самым, когнитивную функцию.

е) Антитело к тау-белку, комбинированное с дополнительным ингибитором агрегации тау-белка

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с ингибитором агрегации тау-белка.

ф) Антитело к тау-белку, комбинированное с ингибитором ацетилхолинэстеразы

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с ингибитором ацетилхолинэстеразы (AChEI). AChEI часто применяют в качестве средств первой линии терапии когнитивных симптомов при AD от легкой до умеренной формы. AChEI также широко применяют для лечения AD от умеренной до тяжелой формы, в том числе донепезил, который одобрен для этой субпопуляции. AChEI уменьшают холинергический дефицит, наблюдаемый у пациентов с AD, и улучшают способность пациента осуществлять повседневную деятельность. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает терапию, предусматривающую антитело к тау-белку, определенное в данном документе, и ингибитор ацетилхолинэстеразы.

В одном варианте осуществления AChEI выбран из группы, состоящей из донепезила, галантамина и ривастигмина. AChEI может представлять собой таблетку для перорального применения, желе, сироп или другую форму раствора для перорального применения. AChEI также может представлять собой пластырь для трансдермального применения.

g) Антитело к тау-белку, комбинированное с противосудорожным средством

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с противосудорожным средством.

h) Антитело к тау-белку, комбинированное с противовоспалительным средством

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с противовоспалительным средством.

i) Антитело к тау-белку, комбинированное с антидепрессантом

В терапии, композиции или наборе по настоящему изобретению антитело к тау-белку можно комбинировать с антидепрессантом.

Депрессия является распространенным ранним сопутствующим симптомом деменции при AD. Трициклические антидепрессанты одно время являлись предпочтительными средствами лечения депрессивных симптомов при AD, однако SSRI в значительной степени заменили эти средства. В одном варианте осуществления эсциталопрам представляет собой антидепрессант, поскольку его часто назначают для лечения AD в связи с его благоприятным профилем побочных эффектов и минимальными взаимодействиями с лекарственными средствами. В дополнительном варианте осуществления циталопрам или сертралин представляет собой антидепрессант, поскольку их также часто применяют. В дополнительном варианте осуществления вортиоксетин представляет собой антидепрессант, поскольку он связан с улучшением когнитивной функции и визуализационным доказательством нейронной эффективности у пациентов, страдающих от MDD. Антидепрессант может быть выбран из группы, состоящей из эсциталопрама, сертралина, циталопрама, пароксетина, флуоксетина, венлафаксина, тразодона, миртазапина, вортиоксетина и их генерических форм.

Дополнительный аспект настоящего изобретения направлен на антитело по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающие фрагменты в композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем, вспомогательным средством и/или стабилизатором. Антитела по настоящему изобретению или их эпитопсвязывающие фрагменты можно применять в терапии для лечения таупатии. В типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингиоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза. В более типичном случае таупатия выбрана из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни арги-

рофильных зерен (AGD), психоза, в частности, психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD) и болезни Пика. В частности, таупатии могут быть выбраны из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви.

Лечение, предусматриваемое настоящим изобретением, может быть длительным, и пациент может получать лечение в течение по меньшей мере 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 6 месяцев, 1 года или дольше.

Антитела по настоящему изобретению могут, например, представлять собой моноклональные антитела, получаемые с помощью гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), или могут представлять собой моноклональные антитела, получаемые с помощью рекомбинантных ДНК или других способов, или более предпочтительно могут быть получены с помощью нового раскрытого способа. Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек антител с помощью методик, описанных, например, в Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела можно получать из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела можно получить из гибридом, полученных из В-лимфоцитов селезенки мыши, полученных от мышей, иммунизированных представляющим интерес антигеном, например, в виде клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес антиген. Моноклональные антитела также можно получать из гибридом, полученных из клеток, экспрессирующих антитела, от иммунизированных людей или млекопитающих, отличных от человека, таких как крысы, кролики, собаки, овцы, козы, приматы и т.д.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой человеческое антитело. Человеческие моноклональные антитела, направленные против тау-белка, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы, а не мышинной системы. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в данном документе соответственно мышами HuMAb (от слов "человеческое моноклональное антитело") и мышами KM, и в совокупности называются в данном документе "трансгенными мышами".

Мышь HuMAb содержит минилокус гена человеческого иммуноглобулина, который кодирует не-реаранжированные последовательности вариабельных и константных доменов тяжелых цепей (μ и γ) и вариабельных и константных доменов легких цепей (κ) человеческого иммуноглобулина, вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы, кодирующие μ - и κ -цепи (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Соответственно у мышей проявляется пониженная экспрессия IgM или IgK, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены, кодирующие человеческую тяжелую и легкую цепи, подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием высокоаффинных моноклональных антител IgG человека κ -изотипа (Lonberg N. et al. (1994), выше; обзор которых приведен в Lonberg N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg N. and Huszar D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) и Harding F. and Lonberg N., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaillon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). См. также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7, HCo12, HCo17 и HCo20 имеют JKD-разрушение в своих эндогенных генах легких цепей (каппа) (описанное в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993)), CMD-разрушение в своих эндогенных генах тяжелых цепей (описанное в примере 1 WO 01/14424) и трансген KCo5, кодирующий человеческую легкую каппа-цепь (описанный в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Дополнительно, мыши HCo7 имеют трансген HCo7, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в US 5770429), мыши HCo12 имеют трансген HCo12, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в примере 2 WO 01/14424), мыши HCo17 имеют трансген HCo17, кодирующий человеческую тяжелую цепь (описанный в примере 2 WO 01/09187), а мыши HCo20 имеют трансген HCo20, кодирующий человеческую тяжелую цепь. Полученные в результате мыши экспрессируют трансгены, кодирующие тяжелую и легкую каппа-цепи иммуноглобулина человека в генетическом окружении, гомозиготном в отношении разрушения эндогенных локусов мышинной тяжелой и легкой каппа-цепей.

У мышей линии KM эндогенный ген мышинной легкой каппа-цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993), и эндогенный ген мышинной тяжелой цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в примере 1 WO 01/09187. Эта линия

мышей несет трансген KCo5, кодирующий человеческую легкую каппа-цепь, описанный в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Эта линия мышей также несет трансхромосому, кодирующую человеческую тяжелую цепь, состоящую из hCF-фрагмента хромосомы 14 (SC20), описанную в WO 02/43478. Мышей HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c и HCo20-Balb/c можно получить путем скрещивания HCo12, HCo17 и HCo20 с KCo5[J/K](Balb), как описано в WO 09/097006.

Мыши rTg4510 представляют собой известную модель таупатии, обеспечивающую временной и пространственный контроль над экспрессией трансгена, кодирующего мутантный тау-белок. У мышей линии КМ эндогенный ген мышинной легкой каппа-цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993), и эндогенный ген мышинной тяжелой цепи был подвергнут гомозиготному разрушению, как описано в примере 1 WO 01/09187. Эта линия мышей несет трансген KCo5, кодирующий человеческую легкую каппа-цепь, описанный в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Данная линия мышей также несет трансхромосому, кодирующую человеческую тяжелую цепь, состоящую из отвечающего за связывание с эпитопом hCF-фрагмента хромосомы 14 (SC20), описанного в WO 02/43478.

Спленоциты от этих трансгенных мышей можно применять для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, согласно хорошо известным методикам. Человеческие моноклональные или поликлональные антитела по настоящему изобретению или антитела по настоящему изобретению, происходящие от других видов, также можно получать трансгенным путем посредством получения другого млекопитающего, отличного от человека, или растения, являющихся трансгенными по представляющим интерес последовательностям тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, и получения из них антитела в извлекаемой форме. Что касается получения антител у млекопитающих трансгенным путем, антитела могут быть получены в молоке коз, коров или других млекопитающих и извлечены из него (см., например, US 5827690; US 5756687; US 5750172 и US 5741957).

Антитело по настоящему изобретению может относиться к любому изотипу. Выбор изотипа обычно будет определяться требуемыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Иллюстративными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно использовать константные домены любой из человеческих легких цепей каппа- или лямбда-типа. При необходимости класс антитела к тау-белку по настоящему изобретению можно переключить с помощью известных способов. Например, антитело по настоящему изобретению, которое изначально представляло собой IgM, можно подвергнуть переключению класса на антитело IgG по настоящему изобретению. Дополнительно методики переключения класса можно применять для превращения одного подкласса IgG в другой, например из IgG1 в IgG2. Таким образом, эффекторную функцию антител по настоящему изобретению можно изменить путем переключения изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических путей применения. В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1, например, IgG1 к-изотипа. Считают, что антитело относится к конкретному изотипу, если его аминокислотная последовательность наиболее гомологична такому изотипу по сравнению с другими изотипами.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой полномерное антитело, предпочтительно антитело IgG, в частности, антитело IgG1 к-изотипа. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой эпитопсвязывающий фрагмент антитела или одноцепочечное антитело.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты можно, например, получать путем разделения на эпитопсвязывающие фрагменты с помощью традиционных методик, а эпитопсвязывающие фрагменты подвергать скринингу в отношении полезности таким же образом, как описано в данном документе для полных антител. Например, эпитопсвязывающие F(ab')₂-фрагменты можно получать путем обработки антитела пепсином. Полученный в результате эпитопсвязывающий F(ab')₂-фрагмент можно обработать для восстановления дисульфидных мостиков с получением эпитопсвязывающих Fab'-фрагментов. Эпитопсвязывающие Fab-фрагменты можно получать путем обработки антитела IgG папаином; эпитопсвязывающие Fab'-фрагменты можно получать путем расщепления антитела IgG пепсином. Эпитопсвязывающий F(ab')-фрагмент также можно получить посредством связывания Fab', описанных ниже, с помощью тиоэфирной связи или дисульфидной связи. Эпитопсвязывающий Fab'-фрагмент представляет собой эпитопсвязывающий фрагмент антитела, полученный путем разрезания дисульфидной связи в шарнирном домене F(ab')₂. Эпитопсвязывающий Fab'-фрагмент можно получить путем обработки эпитопсвязывающего F(ab')₂-фрагмента восстановителем, таким как дитиотреитол. Эпитопсвязывающий фрагмент антитела также можно получить посредством экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих такие эпитопсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть эпитопсвязывающего F(ab')₂-фрагмента, может содержать последовательности ДНК, кодирующие CH1-домен и шарнирный домен H-цепи, за которыми расположен стоп-кодон для остановки трансляции, для получения такой усеченной молекулы эпитопсвязывающего фрагмента антитела.

В одном варианте осуществления антитело к тау-белку представляет собой одновалентное антите-

ло, предпочтительно одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), имеющее делецию в шарнирной области. Соответственно в одном варианте осуществления антитело представляет собой одновалентное антитело, где указанное антитело к тау-белку сконструировано с помощью способа, включающего: i) обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь указанного одновалентного антитела, при этом указанная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-область выбранного антиген-специфичного антитела к тау-белку, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CL-область Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-область выбранного антиген-специфичного антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область Ig, функционально связаны друг с другом, и где в случае с подтипом IgG1 нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-область, была модифицирована таким образом, чтобы CL-область не содержала каких-либо аминокислот, способных образовывать дисульфидные связи или ковалентные связи с другими пептидами, содержащими идентичную аминокислотную последовательность CL-области, в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении животному или человеку; ii) обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь указанного одновалентного антитела, при этом указанная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-область выбранного антиген-специфичного антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную CH-область человеческого Ig, где нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область, была модифицирована таким образом, чтобы область, соответствующая шарнирной области и, как того требует подтип Ig, другим областям CH-области, таким как CH3-область, не содержала каких-либо аминокислотных остатков, принимающих участие в образовании дисульфидных связей или ковалентных или стабильных нековалентных связей между тяжелыми цепями с другими пептидами, содержащими идентичную аминокислотную последовательность CH-области человеческого Ig, в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении животному или человеку, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-область выбранного антиген-специфичного антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-область указанного Ig, функционально связаны друг с другом; iii) обеспечение клеточной системы экспрессии для получения указанного одновалентного антитела; iv) получение указанного одновалентного антитела путем совместной экспрессии конструкций нуклеиновых кислот из (i) и (ii) в клетках клеточной системы экспрессии из (iii).

Подобным образом, в одном варианте осуществления антитело к тау-белку по настоящему изобретению представляет собой одновалентное антитело, которое содержит:

(i) вариабельный домен антитела по настоящему изобретению, описанный в данном документе, или эпитопсвязывающую часть указанного домена, и

(ii) CH-домен иммуноглобулина или его домен, содержащий CH2- и CH3-домены, где CH-домен или его домен был модифицирован таким образом, чтобы домен, соответствующий шарнирному домену и, если иммуноглобулин не относится к подтипу IgG4, другим доменам CH-домена, таким как CH3-домен, не содержал каких-либо аминокислотных остатков, способных образовывать дисульфидные связи с идентичным CH-доменом или другие ковалентные или стабильные нековалентные связи между тяжелыми цепями с идентичным CH-доменом в присутствии поликлонального IgG человека.

В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь одновалентного антитела по настоящему изобретению была модифицирована таким образом, чтобы вся шарнирная область была подвергнута делеции.

В другом дополнительном варианте осуществления последовательность одновалентного антитела была модифицирована таким образом, чтобы она не содержала каких-либо акцепторных сайтов N-связанного гликозилирования.

Настоящее изобретение также включает "биспецифические антитела", где область связывания антитела с тау-белком (например, область связывания с тау-белком моноклонального антитела к тау-белку) является частью двухвалентного или поливалентного биспецифического остова, который нацеливается более чем на один эпитоп (например, второй эпитоп может включать эпитоп рецептора, участвующего в активном транспорте, так что биспецифическое антитело будет проявлять улучшенный транзитоз через биологический барьер, такой как гематоэнцефалический барьер). Таким образом, в другом дополнительном варианте осуществления одновалентный Fab антитела к тау-белку может быть соединен с дополнительным Fab или scFv, который нацеливается на другой белок, с получением биспецифического антитела. Биспецифическое антитело может иметь двойную функцию, например, терапевтическую функцию, придаваемую доменом антитела, связывающимся с тау-белком, и транспортную функцию, благодаря которой оно может связываться с молекулой рецептора для усиления переноса через биологический барьер, такой как гематоэнцефалический барьер.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также включают одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела представляют собой пептиды, в которых Fv-домены тяжелой и легкой цепей соединены друг с другом. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает одноцепочечный Fv (scFv), где тяжелая и легкая цепи в Fv антитела к тау-белку по настоящему изобретению соединены с помощью гибкого пептидного линкера (в типичном случае

длиной приблизительно 10, 12, 15 или более аминокислотных остатков) в одну пептидную цепь. Способы получения таких антител описаны, например, в US 4946778, Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) и McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используется только один VH и VL, двухвалентным, если используются два VH и VL, или поливалентным, если используется более двух VH и VL.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, можно модифицировать путем включения любого подходящего количества модифицированных аминокислот и/или ассоциаций с такими конъюгированными заместителями. Пригодность в данном контексте обычно определяется способностью по меньшей мере в значительной степени сохранять селективность в отношении тау-белка и/или специфичность в отношении тау-белка, присущую недериватизированному исходному антителу к тау-белку. Включение одной или нескольких модифицированных аминокислот может быть преимущественным, например, для увеличения периода полужизни полипептида в сыворотке крови, уменьшения антигенности полипептида или повышения стабильности полипептида при хранении. Аминокислота(аминокислоты) поддается модификации, например, котрансляционно или посттрансляционно в ходе получения рекомбинантным путем (например, N-связанное гликозилирование в мотивах N-X-S/T в ходе экспрессии в клетках млекопитающих), или поддается модификации с помощью синтетических способов. Неограничивающие примеры модифицированной аминокислоты включают гликозилированную аминокислоту, сульфатированную аминокислоту, пренилированную (например, фарнезилированную, геранилгеранилированную) аминокислоту, ацетилованную аминокислоту, ацилированную аминокислоту, пегилированную аминокислоту, биотинилированную аминокислоту, карбоксилированную аминокислоту, фосфорилированную аминокислоту и т.п. В литературе представлено множество источников, подходящих в качестве руководства для специалиста по модификации аминокислот. Примеры протоколов находятся в Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. Модифицированная аминокислота может быть выбрана, например, из гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилованной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидным фрагментом, или аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватирующим средством.

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также можно модифицировать химическим путем посредством ковалентного конъюгирования с полимером, например, для увеличения их периода полувыведения из кровотока. Иллюстративные полимеры и способы присоединения их к пептидам приведены, например, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. Дополнительные иллюстративные полимеры включают полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG с молекулярной массой от приблизительно 1000 до приблизительно 40000, как, например, от приблизительно 2000 до приблизительно 20000, например приблизительно 3000-12000 г/моль).

Антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно дополнительно применять в способе диагностики или в качестве диагностического визуализирующего лиганда.

В одном варианте осуществления предусмотрены антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, содержащие одну или несколько аминокислот, меченных радиоактивными изотопами. Антитело к тау-белку, меченное радиоактивным изотопом, можно применять как в диагностических, так и в терапевтических целях (конъюгирование с молекулами, меченными радиоактивными изотопами, является другой возможной характерной особенностью). Неограничивающие примеры таких меток включают без ограничения висмут (^{213}Bi), углерод (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), хром (^{51}Cr), кобальт (^{57}Co , ^{60}Co), медь (^{64}Cu), диспрозий (^{165}Dy), эрбий (^{169}Er), фтор (^{18}F), гадолиний (^{153}Gd , ^{159}Gd), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), германий (^{68}Ge), золото (^{198}Au), гольмий (^{166}Ho), водород (^3H), индий (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), йод (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), иридий (^{192}Ir), железо (^{59}Fe), криптон ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), лантан (^{140}La), лютеций (^{177}Lu), марганец (^{54}Mn), молибден (^{99}Mo), азот (^{13}N , ^{15}N), кислород (^{15}O), палладий (^{103}Pd), фосфор (^{32}P), калий (^{42}K), празеодим (^{142}Pr), прометий (^{149}Pm), рений (^{186}Re , ^{188}Re), родий (^{105}Rh), рубидий (^{81}Rb , ^{82}Rb), рутений (^{82}Ru , ^{97}Ru), самарий (^{153}Sm), скандий (^{47}Sc), селен (^{75}Se), натрий (^{24}Na), стронций (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), селен (^{75}Se), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), ксенон (^{133}Xe), иттербий (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), иттрий (^{90}Y), цинк (^{65}Zn) и цирконий (^{89}Zr). Цирконий (^{89}Zr) представляет особый интерес. Способы получения аминокислот, меченных радиоактивными изотопами, и соответствующих производных пептидов известны из уровня техники (см., например, Junghans et al., в *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и US 4681581; US 4735210; US 5101827; US 5102990 (US RE35500), US 5648471 и US 5697902. Например, радиоактивный изотоп можно конъюгировать с помощью способа с применением хлорамина T (Lindegren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Thiomethylstannyl)Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36(9): 1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated

antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

Настоящее изобретение также предусматривает антитела к тау-белку и их эпитопсвязывающие фрагменты, меченные с помощью выявляемых флуоресцентной метки (такой как хелат редкоземельного элемента (например, хелат европия)), метки флуоресцеинового типа (например, флуоресцеина, изотиоцианата флуоресцеина, 5-карбоксифлуоресцеина, 6-карбоксифлуоресцеина, дихлортриазиниламинофлуоресцеина), метки родаминового типа (например, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® или дансилхлорида), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), фикоэритрина; умбеллиферона, лиссамина; цианина; фикоэритрина, тейксаского красного, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) или его аналога, все из которых подходят для оптического выявления. Можно использовать хемилюминесцентные метки (например, люминол, люциферазу, люциферин и экворин). Такую диагностику и выявление также можно осуществить путем связывания диагностической молекулы по настоящему изобретению с выявляемыми веществами, в том числе без ограничения различные ферменты, при этом ферменты включают без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу, или с комплексами с простетическими группами, такие как без ограничения стрептавидин/биотин и авидин/биотин.

Можно использовать хемилюминесцентные метки (например, люминол, люциферазу, люциферин и экворин). Такую диагностику и выявление также можно осуществить путем связывания диагностической молекулы по настоящему изобретению с выявляемыми веществами, в том числе без ограничения различные ферменты, при этом ферменты включают без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу, или с комплексами с простетическими группами, такие как без ограничения стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Также можно использовать парамагнитные метки, и их предпочтительно выявляют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT). Такие парамагнитные метки включают без ограничения соединения, содержащие парамагнитные ионы алюминия (Al), бария (Ba), кальция (Ca), церия (Ce), диспрозия (Dy), эрбия (Er), европия (Eu), гадолиния (Gd), гольмия (Ho), иридия (Ir), лития (Li), магния (Mg), марганца (Mn), молибдена (Mo), неодимия (Nd), осмия (Os), кислорода (O), палладия (Pd), платины (Pt), родия (Rh), рутения (Ru), самария (Sm), натрия (Na), стронция (Sr), тербия (Tb), тулия (Tm), олова (Sn), титана (Ti), вольфрама (W), и циркония (Zr), и, в частности, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} и V^{+4} , позитронно-активные металлы с использованием различных видов позитронно-эмиссионной томографии и нерадиоактивных парамагнитных ионов металлов.

Таким образом, в одном варианте осуществления антитело к тау-белку или его фрагмент, связывающийся с тау-белком, по настоящему изобретению могут быть мечеными флуоресцентной меткой, хемилюминесцентной меткой, парамагнитной меткой, радиоизотопной меткой или ферментной меткой. Меченое антитело или его фрагмент можно применять для выявления наличия или измерения количества указанного тау-белка в головном мозге субъекта. Этот способ может включать выявление или измерение количества антитела к тау-белку или фрагмента, связывающегося с тау-белком, связанного с указанным тау-белком, посредством визуализации *in vivo* и может включать визуализацию *ex vivo* указанного антитела к тау-белку или фрагмента, связывающегося с тау-белком, связанного с таким тау-белком.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, кодирующему одну или несколько полипептидных цепей антитела по настоящему изобретению или его фрагмента, связывающегося с тау-белком. Такие векторы экспрессии можно применять для получения антител или их эпитопсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению рекомбинантным путем.

Вектор экспрессии в контексте настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий ДНК- или РНК-вектор, в том числе хромосомные, нехромосомные векторы и векторы на основе синтетической нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные в результате объединения плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к тау-белку, содержится в векторе на основе "голой" ДНК или РНК, включающем, например, линейный экспрессионный элемент (описанный, например, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), вектор на основе плотно упакованной нуклеиновой кислоты (описанный, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, вектор минимального размера "midgie" на основе нуклеиновой кислоты (описанный, например, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или представлена в виде осаждаемой векторной конструкции нуклеиновой кислоты, такой как конструкция, осаждаемая CaPO_4 (описанная, например, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Такие векторы на основе нуклеиновых кислот и их применение хорошо известны из уровня техники (см., например, US 5589466 и US 5973972).

В одном варианте осуществления вектор подходит для экспрессии антител к тау-белку или их эпитопсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению в бактериальной клетке. Примеры таких век-

торов включают векторы экспрессии, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин) и т.п.

Вектор экспрессии может также или в качестве альтернативы представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как промотор гена фактора альфа, алкогольоксидазы и PGH (обзор которых приведен в F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. et al. Methods Mol. Biol. 824, 329-358 (2012), Celik, E. et al., Biotechnol. Adv. 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 142(2), 105-124 (2007), Boer E. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. Methods Mol. Biol. 178, 359-366 (2002), и Holliger, P. Methods Mol. Biol. 178, 349-357 (2002)).

В векторе экспрессии по настоящему изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к тау-белку, могут содержать любой подходящий промотор, энхансер и другие элементы, способствующие экспрессии, или быть связанными с ними. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, IE промотор/энхансер CMV человека, а также LTR промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV), эффективные поли-(A)-последовательности терминации, точку начала репликации для продукта плазмиды в E.coli, ген устойчивости к антибиотикам в качестве селективного маркера и/или подходящий сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцируемый промотор, а не конститутивный промотор, такой как IE CMV (специалист в данной области техники поймет, что такие термины фактически описывают степень экспрессии гена в определенных условиях).

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, такой как трансфектома, которая вырабатывает антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, определенные в данном документе, или биспецифическую молекулу по настоящему изобретению, определенную в данном документе. Примеры клеток-хозяев включают клетки дрожжей, бактерий и млекопитающих, такие как клетки СНО или НЕК. Например, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессируемое антитело к тау-белку по настоящему изобретению или его эпитопсвязывающий фрагмент. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагида или линейный экспрессионный элемент, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессируемое антитело к тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антитела к тау-белку по настоящему изобретению, при этом указанный способ включает стадии а) культивирования гибридомы или клетки-хозяина по настоящему изобретению, описанных в данном документе выше, и b) очистки антитела по настоящему изобретению от культуральной среды.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к препарату в том смысле, в котором этот термин используется в данном документе, который содержит антитело к тау-белку, определенное в данном документе, и который практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях, которые либо не способны связываться с тау-белком, либо существенным образом не изменяют функциональные характеристики антитела к тау-белку в препарате. Таким образом, такой препарат не охватывает сыворотку крови, образующуюся в естественных условиях, или очищенный производный продукт такой сыворотки крови, который содержит смесь антитела к тау-белку и другого антитела, которое не изменяет функциональные характеристики антитела к тау-белку в препарате, где такие функциональные характеристики представляют собой

- (i) практически отсутствующую способность к связыванию с нефосфорилированным тау-белком;
- (ii) практически отсутствующую способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S404 и не фосфорилированным в S396;
- (iii) способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S396;
- (iv) способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным как в S396, так и в S404;
- (v) способность к селективному проведению различий между фосфорилированными остатками S396 и S404 тау-белка, так что они практически не способны связываться с фосфорилированным остатком 404;
- (vi) способность к связыванию с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера;
- (vii) способность к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и/или
- (viii) способность к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полосы тау-белка размером 55 кДа

более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей гTg4510 или способность к специфичному уменьшению полос фосфорилированного в S396 гиперфосфорилированного тау-белка по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полос негиперфосфорилированного тау-белка более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с посмертными экстрактами из головного мозга людей с AD.

Настоящее изобретение, в частности, относится к препаратам такого антитела к тау-белку, имеющего структурное изменение в своей аминокислотной последовательности (в любых своих CDR, вариабельных доменах, остатках каркасной области и/или константных доменах) по сравнению со структурой встречающегося в природе антитела к тау-белку, где указанное структурное изменение обуславливает проявление антителом к тау-белку значительно измененных функциональных характеристик (т. е. более чем с 20% различием, более чем с 40% различием, более чем с 60% различием, более чем с 80% различием, более чем со 100% различием, более чем со 150% различием, более чем с 2-кратным различием, более чем с 4-кратным различием, более чем с 5-кратным различием или более чем с 10-кратным различием в функциональных характеристиках) по сравнению с функциональными характеристиками, проявляемыми указанным встречающимся в природе антителом к тау-белку; где указанные функциональные характеристики представляют собой:

- (i) практически отсутствующую способность к связыванию с нефосфорилированным тау-белком;
- (ii) практически отсутствующую способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S404 и не фосфорилированным в S396;
- (iii) способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S396;
- (iv) способность к связыванию с тау-белком, фосфорилированным как в S396, так и в S404;
- (v) способность к селективному проведению различий между фосфорилированными остатками S396 и S404 тау-белка, так что они практически не способны связываться с фосфорилированным остатком 404;
- (vi) способность к связыванию с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера;
- (vii) способность к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и/или

(viii) способность к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полосы тау-белка размером 55 кДа более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей гTg4510 или способности к специфичному уменьшению полос фосфорилированного в S396 гиперфосфорилированного тау-белка по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полос негиперфосфорилированного тау-белка более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с экстрактами головного мозга, полученными посмертно от людей с AD.

Термин "практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях" относится к полному отсутствию таких антител, образующихся в естественных условиях, в таких препаратах или к включению таких антител, образующихся в естественных условиях, в такие препараты в концентрации, в которой они существенным образом не влияют на свойства связывания с тау-белком данных препаратов. Говорят, что антитело является "выделенным", если оно не имеет эквивалента, образующегося в естественных условиях, или было отделено или очищено от компонентов, которые в естественных условиях сопутствуют ему.

Термин "антитела, образующиеся в естественных условиях", используемый в отношении таких препаратов, относится к антителам (в том числе аутоантителам, образующимся в естественных условиях), образование которых вызывается в организме людей или других животных как естественное следствие функционирования их иммунных систем.

Таким образом, препараты по настоящему изобретению не исключают, а в действительности явным образом охватывают препараты, которые содержат антитело к тау-белку и преднамеренно добавленное дополнительное антитело, способное связываться с эпитопом, не содержащимся в тау-белке. Такие препараты, в частности, включают их варианты осуществления, в которых препарат проявляет повышенную эффективность в лечении болезни Альцгеймера (AD), болезни аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP) и кортикобазальной дегенерации (CBD). Дополнительно, настоящее изобретение направлено на препараты, которые содержат антитело антитела к тау-белку или их эпитопсвязывающие фрагменты, предназначенные для применения в лечении психоза, в частности, психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви. Дополнительно препараты по настоящему изобретению содержат антитело антитела к тау-белку или их эпитопсвязывающие фрагменты, которые можно применять в лечении инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

- (i) антитело к тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент, оба из которых определены в дан-

ном документе, или препарат в том смысле, в котором этот термин определен в данном документе, который содержит такое антитело к тау-белку или его эпитопсвязывающий фрагмент; и

(ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции можно составлять с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными вспомогательными средствами и наполнителями согласно традиционным методикам, таким как раскрытые в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные вспомогательные средства и наполнители должны быть пригодными для выбранного соединения по настоящему изобретению и выбранного способа введения. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного отрицательного влияния на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем существенного влияния (10% или меньшего относительноного подавления, 5% или меньшего относительного подавления и т.п.)) на связывание с эпитопом.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может содержать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или белковые свободные аминокислоты), консерванты, фиксаторы для тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический раствор с фосфатным буфером, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав также могут содержать другие носители или нетоксичные нетерапевтические неиммуногенные стабилизаторы и т.п. Композиции также могут содержать крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (например, функционализированную латексом сефарозу, агарозу, целлюлозу и т.п.), полимеры аминокислот, сополимеры аминокислот и липидные агрегаты (например, капли масла или липосомы).

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза подвергаемого лечению пациента, а также аналогичных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическую композицию можно вводить любым подходящим путем и способом, в том числе парентеральным, местным, пероральным или интраназальным путями, для профилактического и/или терапевтического лечения. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят парентерально. Используемые в данном документе фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают в себя эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, внутричрепную, интраторакальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Дополнительные подходящие пути введения соединения по настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны из уровня техники и могут быть выбраны специалистами обычной квалификации в данной области техники.

В одном варианте осуществления эту фармацевтическую композицию вводят посредством внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

Фармацевтически приемлемые носители включают всевозможные подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства, придающие изотоничность, антиоксиданты и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми с соединением по настоящему изобретению.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и/или раз-

личные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для индивидуального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металлохелаторы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать изотонические средства, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия, в композициях.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы, диспергирующие вещества, консерванты или буферы, которые могут повышать сохраняемость или эффективность фармацевтической композиции. Соединения по настоящему изобретению можно получать с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, в том числе имплантатов, трансдермальных пластырей и микроинкапсулированных систем доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена и винилацетата, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочную кислоту отдельно или вместе с воском, или другие материалы, хорошо известные из уровня техники. Способы получения таких составов в целом известны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению можно составлять для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для индивидуального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включение в композицию средств, придающих изотоничность, например Сахаров, многоатомных спиртов, таких как глицерин, маннит, сорбит, или хлорида натрия. Длительного всасывания инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию средства, замедляющего всасывание антитела, например, моностеаратных солей и желатина. Стерильные инъекционные растворы можно получить путем помещения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Обычно дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), в результате которой получают порошкообразный активный ингредиент плюс любой

дополнительный требуемый ингредиент из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Стерильные инъекционные растворы можно получить путем помещения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Обычно дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильный среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), в результате которой получают порошкообразный активный ингредиент плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Режимы дозирования в вышеуказанных способах лечения и путях применения, описанных в данном документе, корректируют для получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как определяется потребностями терапевтической ситуации. Композиции для парентерального введения можно составлять в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, совместно с необходимым фармацевтическим носителем. Технические требования к единичным лекарственным формам по настоящему изобретению продиктованы (а) уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, которого необходимо достичь, и (b) ограничениями, присущими области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов, и непосредственно зависят от них.

Эффективные дозы и режимы дозирования антител или их эпитопсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области. В любой заданный день, когда дают дозу, доза может находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг/кг и чаще от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг/кг веса тела реципиента. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг веса тела или 10 мг/кг веса тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг веса тела. Таким образом, иллюстративные дозы включают от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг/веса тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг/веса тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 2 мг/кг/веса тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 мг/кг/веса тела, например, приблизительно 0,15 мг/кг/веса тела, приблизительно 0,2 мг/кг/веса тела, приблизительно 0,5 мг/кг/веса тела, приблизительно 1 мг/кг/веса тела, приблизительно 1,5 мг/кг/веса тела, приблизительно 2 мг/кг/веса тела, приблизительно 5 мг/кг/веса тела или приблизительно 10 мг/кг/веса тела.

Врач со стандартной квалификацией в данной области легко может определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач может начинать с доз антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, используемых в фармацевтической композиции, на более низких уровнях, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу до достижения желаемого эффекта. В целом, подходящей суточной дозой композиции по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является наиболее низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов. Введение может быть, например, внутривенным, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным или подкожным. При желании эффективную суточную дозу фармацевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более частей дозы, вводимых по отдельности с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно в виде единичных лекарственных форм. Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно вводить соединение в виде фармацевтической композиции, описанной выше.

Меченые антитела или их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять в диагностических целях для выявления, диагностики или мониторинга заболеваний или нарушений. Настоящее изобретение предусматривает выявление или диагностику нейродегенеративного или когнитивного заболевания или нарушения, в том числе без ограничения болезни Альцгеймера, болезни аргиофильных зерен (AGD), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP) и кортикобазальной дегенерации (CBD), включающие: (а) проведение анализа наличия пироглутамилированных Aβ-фрагментов в клетках или образцах тканей субъекта с помощью одного или нескольких антител, специфично связывающихся с тау-белком; и (b) проведение сравнения уровня антигена с контрольным уровнем, например с уровнями в нормальных образцах тканей, при котором повышение анализируемого уровня антигена по сравнению с контрольным уровнем антигена свидетельствует о заболевании или на-

рушении или свидетельствует о тяжести заболевания или нарушения.

Антитела или их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно применять для анализа тау-белка или фрагментов тау-белка в биологическом образце с помощью иммуногистохимических способов, хорошо известных из уровня техники. Другие способы с использованием антител, применимые для выявления белка, включают иммунологические анализы, такие как иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунологический анализ (RIA), а также анализы с использованием платформы Meso Scale Discovery (MSD). В таких наборах и способах можно применять подходящие метки для антител, и метки, известные из уровня техники, включают ферментные метки, такие как щелочная фосфатаза и глюкозооксидаза; радиоизотопные метки, такие как йод (^{125}I , ^{131}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); а также люминесцентные метки, такие как люминол и люцифераза; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин.

Наличие меченых антител к тау-белку или их фрагментов, связывающихся с тау-белком, можно выявлять *in vivo* в диагностических целях. В одном варианте осуществления диагностика предусматривает а) введение субъекту эффективного количества такой меченой молекулы; б) ожидание в течение некоторого промежутка времени после введения для обеспечения концентрирования меченой молекулы в местах отложения Аβ (при наличии таковых) и для обеспечения очищения от несвязанной меченой молекулы до фонового уровня; в) определение фонового уровня и д) выявление меченой молекулы у субъекта, таким образом, что выявление меченой молекулы на уровне, превышающем фоновый, свидетельствует о том, что у субъекта имеется заболевание или нарушение, или свидетельствует о тяжести заболевания или нарушения. В соответствии с таким вариантом осуществления молекулу метят визуализирующим компонентом, подходящим для выявления с помощью конкретной системы визуализации, известной специалистам в данной области техники. Фоновые уровни можно определить с помощью различных способов, известных из уровня техники, в том числе путем сравнения количества выявленного меченого антитела со стандартным значением, предварительно определенным для конкретной системы визуализации. Способы и системы, которые можно применять в способах диагностики по настоящему изобретению, включают без ограничения компьютерную томографию (СТ), сканирование всего тела, такое как позитронно-эмиссионная томография (PET), магнитно-резонансная визуализация (MRI) и ультразвуковое исследование.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, определенные в данном документе, для применения в терапии.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, определенные в данном документе, для применения в лечении, диагностике или визуализации таупатий.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, определенные в данном документе, для применения в лечении болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP) и кортикобазальной дегенерации (CBD).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, определенные в данном документе, для применения в производстве лекарственного препарата для лечения, диагностики или визуализации таупатий.

Лекарственный препарат предпочтительно предназначен для лечения болезни Альцгеймера (AD), болезни аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP) и кортикобазальной дегенерации (CBD), наиболее предпочтительно болезни Альцгеймера (AD). Лекарственный препарат также предпочтительно предназначен для лечения психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения, диагностики или визуализации болезни Альцгеймера или других таупатий у субъекта, при этом указанный способ включает введение лекарственного препарата на основе моноклонального антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента, определенных в данном документе, указанному субъекту в эффективном количестве.

В предпочтительном варианте осуществления лечение является длительным и предпочтительно продолжается в течение по меньшей мере 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, 6 месяцев, 1 года или дольше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий антитело или его фрагмент, определенные в данном документе, для применения в терапии.

Перечень вариантов осуществления

1. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с фосфорилированным остатком 396 человеческого тау-белка (SEQ ID NO: 1) таким образом, что антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент практически не связывается с SEQ ID NO: 1, фосфорилированной по остатку 404, в случае, если остаток 396 не является фосфорилированным.

2. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществ-

ления 1, которые ингибируют РЗ из материала от субъектов с АД в жидкофазном анализе ингибирования таким образом, что моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент характеризуются IC_{50} , составляющей 100 нМ или меньше, как, например, от 0,1 нМ до 100 нМ, как, например, концентрацией, составляющей 50 нМ или меньше, как, например, от 0,1 нМ до 50 нМ.

3. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1 или 2, при этом они способны удалять по меньшей мере 15% тау-белка, фосфорилированного по серину-396, из гомогенатов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера при содержании антитела, составляющем приблизительно 75 нг, что определяют согласно сигналу тау-белка pS396 в вестерн-блоттинге после исследований по иммуноистощению экстрактов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера.

4. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 46;

(b) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 47;

(c) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 48;

(d) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 55;

(e) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 56; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 57.

5. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, содержащие:

(a) легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23; и

(b) тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

6. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1 или 5, где:

(a) легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 12; и

(b) тяжелая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

7. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1 или 5, где:

(a) легкая цепь выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23; и

(b) тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 11.

8. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1 или 4, содержащие:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

9. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1 или 5, содержащие:

(a) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12;

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13.

10. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1 или 4, содержащие по меньшей мере одно из:

(a) CDR1 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3;

(b) CDR2 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

(c) CDR3 легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;

и дополнительно содержащие

(d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;

(e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и

(f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

- [illegible]

- [illegible]

P представляет собой пролин, и S(фосфорилированный) представляет собой серин с фосфорилированной гидроксильной группой боковой цепи.

73. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащие Fc-область.

74. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащие компонент для увеличения периода полувыведения *in vivo* данного средства.

75. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, характеризующиеся специфичным связыванием с человеческим тау-белком, содержащим фосфорилированный остаток 396, согласно следующим критериям тестирования: i) антитело практически не связывается с нефосфорилированным тау-белком; ii) антитело практически не связывается с тау-белком, фосфорилированным в 404, если он при этом не фосфорилирован в 396; iii) антитело связывается с тау-белком, фосфорилированным в 396; и iv) антитело связывается с тау-белком, если как 396, так и 404 являются фосфорилированными.

76. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, образование которых происходит в ответ на дифосфорилированный пептид, содержащий по меньшей мере 18 последовательных аминокислотных остатков, как, например, по меньшей мере 20 последовательных аминокислотных остатков, в пределах TDHGAEIVYK^(p)SPWSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающего остатки 386-408 тау-белка 2N4R.

77. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 76, образование которых происходит в ответ на дифосфорилированный пептид, содержащий 18-40, как, например, 18-30, как, например, 20-30, последовательных аминокислотных остатков, содержащих TDHGAEIVYK^(p)SPWSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающий остатки 386-410 тау-белка 2N4R.

78. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, обладающие специфичностью в отношении фосфорилированного тау-белка (pTau) от пациентов, пораженных AD, по сравнению со здоровыми контрольными субъектами в соответствующей возрастной группе, так что указанные моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент характеризуются различием в специфичности в отношении фосфорилированного тау-белка (pTau) от пациентов, пораженных AD, по сравнению с тау-белком от здоровых контрольных субъектов в соответствующей возрастной группе, представляющим собой более чем 50-кратное, как, например, более чем 100-кратное, повышение специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в основанном на ELISA анализе для выявления фосфорилированного тау-белка (pTau) в гомогенатах головного мозга от субъектов с AD и от здоровых контрольных субъектов с применением специфической схемы 1 ELISA для фосфорилированных и мультимерных молекул.

79. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 78, обладающие специфичностью в отношении тау-белка из материала, пораженного AD, так что указанные моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент характеризуются различием в специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в соответствующей возрастной группе, представляющим собой более чем 50-кратное, как, например, более чем 100-кратное, повышение специфичности в отношении материала, пораженного AD, по сравнению с материалом от здоровых контрольных субъектов в основанном на ELISA анализе для выявления фосфорилированного тау-белка (pTau) в гомогенатах головного мозга от субъектов с AD и от здоровых контрольных субъектов с применением специфической схемы 1 ELISA для фосфорилированных и мультимерных молекул.

80. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, образование которых происходит в ответ на дифосфорилированный пептид:

TDHGAEIVYK^(p)SPWSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO: 2), охватывающий остатки 386-410 тау-белка 2N4R, или его эпитопсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с фосфорилированным остатком 396 человеческого тау-белка.

81. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, которые были получены или произведены в линии клеток, такой как линия человеческих клеток, линия клеток млекопитающего, отличного от человека, линия клеток насекомого, дрожжей или бактерий, или с помощью рекомбинантной технологии.

82. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 81, полученные в линии клеток CHO, линии клеток НЕК, линии клеток ВНК-21, линии мышинных клеток (такой как линия клеток миеломы), линии клеток фибросаркомы, линии клеток PER.C6, линии клеток НКВ-11, линии клеток CAP и линии человеческих клеток HuH-7.

83. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, где указанное моноклональное антитело экспрессируется гибридомой, которая была выделена путем скрининга гибридом с использованием человеческого патологического и непатологического тау-белка для выделения клонов, которые как i) являются специфичными в отношении фосфо-

рированных эпитопов S396, так и ii) специфично распознают гиперфосфорилированный тау-белок из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера, где указанные антитела или их эпитопсвязывающие фрагменты способны различать патологический и непатологический человеческий тау-белок.

84. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, где антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент дополнительно содержат выявляемый компонент.

85. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 84, где выявляемый фрагмент представляет собой флуоресцентную метку, хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку, радиоизотопную метку или ферментную метку.

86. Препарат, содержащий антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, где указанный препарат практически не содержит антител, образующихся в естественных условиях, которые либо не способны связываться с тау-белком, либо существенным образом не изменяют функциональные характеристики антитела к тау-белку в препарате, где указанные функциональные характеристики выбраны из группы, состоящей из:

- (i) практически отсутствующей способности к связыванию с нефосфорилированным тау-белком;
- (ii) практически отсутствующей способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S404 и не фосфорилированным в S396;
- (iii) способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S396;
- (iv) способности к связыванию тау-белка, фосфорилированного как в S396, так и в S404;
- (v) способности к селективному проведению различий между фосфорилированными остатками S396 и S404 тау-белка, так что они практически не способны связываться с фосфорилированным остатком 404 или так что они предпочтительно связываются с S396;
- (vi) способности к связыванию с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера;
- (vii) способности к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и/или
- (viii) способности к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полосы тау-белка размером 55 кДа более чем на 10% при применении согласно описанному в примерах с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей rTg4510.

87. Препарат, содержащий антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1-70, где указанное антитело или его указанный эпитопсвязывающий фрагмент имеют структурное изменение в своей аминокислотной последовательности по сравнению со структурой встречающегося в природе антитела к тау-белку, где указанное структурное изменение обуславливает проявление указанным антителом или указанным фрагментом измененных функциональных характеристик по сравнению с функциональными характеристиками, проявляемыми указанным встречающимся в природе антителом к тау-белку, где указанные функциональные характеристики выбраны из группы, состоящей из:

- (i) практически отсутствующей способности к связыванию с нефосфорилированным тау-белком;
- (ii) практически отсутствующей способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S404 и не фосфорилированным в S396;
- (iii) способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным в S396;
- (iv) способности к связыванию с тау-белком, фосфорилированным как в S396, так и в S404;
- (v) способности к селективному проведению различий между фосфорилированными остатками S396 и S404 тау-белка, так что они практически не способны связываться с фосфорилированным остатком 404 или так что они предпочтительно связываются с S396;
- (vi) способности к связыванию с гиперфосфорилированным тау-белком из головного мозга людей с болезнью Альцгеймера;
- (vii) способности к проведению различий между патологическим и непатологическим человеческим тау-белком и/или
- (viii) способности к специфичному уменьшению полос гиперфосфорилированного тау-белка размером 64 и 70 кДа по меньшей мере на 90% без уменьшения при этом полосы тау-белка размером 55 кДа более чем на 10% при применении согласно описанному в данном документе с иммуноистощенными экстрактами от трансгенных мышей rTg4510.

88. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87 и фармацевтически приемлемый носитель.

89. Нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70 или кодирующая цепь, являющуюся их составляющей.

90. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87, или фарма-

цветическая композиция согласно варианту осуществления 88 для применения в терапии.

91. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87, или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 88 для применения в лечении, диагностике или визуализации таупатии.

92. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87, или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 88 для применения в лечении таупатии, выбранной из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза.

93. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70 для применения в лечении болезни Альцгеймера.

94. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87, или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 88 для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения, диагностики или визуализации таупатии.

95. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, или препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87, или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 88 для применения в качестве лекарственного препарата для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности, психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, апатии, обусловленной AD, или апатии у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза.

96. Способ лечения, диагностики или визуализации болезни Альцгеймера или других таупатий у субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества моноклонального антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-70, препарата согласно любому из вариантов осуществления 86-87 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 88.

97. Способ согласно варианту осуществления 96, где лечение является длительным.

98. Способ согласно варианту осуществления 97, где длительное лечение продолжают в течение по меньшей мере 2 недель, как, например, в течение по меньшей мере 1 месяца, в течение по меньшей мере 6 месяцев или в течение по меньшей мере 1 года.

99. Способ согласно любому из вариантов осуществления 96-98, где субъектом является человек.

100. Набор, содержащий антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-70, препарат согласно любому из вариантов осуществления 86-87 или фармацевтическую композицию согласно варианту осуществления 88, для применения в терапии.

101. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент согласно вариантам осуществления 1-70, или препарат или фармацевтическая композиция, содержащие указанные антитело или фрагмент, для применения в выявлении наличия или измерении количества указанного тау-белка в головном мозге субъекта.

102. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, препарат или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 88, где указанное выявление или измерение предусматривает визуализацию *in vivo* указанного антитела к тау-белку, связанного с указанным тау-белком.

103. Моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, препарат или фармацевтическая композиция согласно вариантам осуществления 99-100, где указанное выявление или измерение предусматривает визуализацию *ex vivo* указанного антитела к тау-белку или его указанного фрагмента, связанных с указанным тау-белком.

104. Способ удаления по меньшей мере 90% гиперфосфорилированного тау-белка из клубка, при этом указанный клубок содержит гиперфосфорилированный тау-белок, при этом указанный способ предусматривает приведение гиперфосфорилированного тау-белка в контакт с моноклональным антителом или его эпитопсвязывающим фрагментом, которые являются селективными в отношении тау-белка, имеющего фосфорилированный остаток 396, и которые определены в любом из вариантов осуществления 1-70.

105. Способ задержки прогрессирования болезни Альцгеймера у пациента, при этом указанный способ предусматривает уменьшение или ослабление накопления патологического тау-белка у указанного пациента путем введения моноклонального антитела или его эпитопсвязывающего фрагмента, при этом указанное моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент являются селективными в отношении тау-белка, имеющего фосфорилированный остаток 396, и определены в любом из вариантов осуществления 1-70.

106. Фармацевтическая композиция, содержащая:

i) антитело к тау-белку согласно вариантам осуществления 1-70 и, в частности, вариантам осуществления 17, 18, 44 или 45, и

ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из:

- a) ингибитора BACE;
- b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
- c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
- d) антагонистов NMDA-рецептора;
- e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка;
- e) ингибитора ацетилхолинэстеразы;
- f) противоэпилептического средства;
- g) противовоспалительного лекарственного средства и
- h) SSRI; и

iii) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

107. Способ лечения болезни Альцгеймера, уменьшения прогрессирования AD или уменьшения выраженности симптомов AD, предусматривающий терапию, предусматривающую введение i) антитела к тау-белку согласно вариантам осуществления 1-70 и, в частности, вариантам осуществления 17, 18, 44 или 45, и ii) соединения, выбранного из группы, состоящей из:

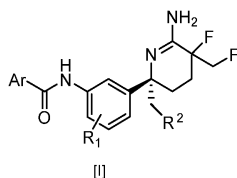
- a) ингибитора BACE;
- b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
- c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
- d) антагонистов NMDA-рецептора;
- e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка;
- e) ингибитора ацетилхолинэстеразы;
- f) противоэпилептического средства;
- g) противовоспалительного лекарственного средства и
- h) SSRI.

108. Набор, содержащий: i) композицию, содержащую антитело к тау-белку согласно вариантам осуществления 1-70 и, в частности, вариантам осуществления 17, 18, 44 или 45, и ii) композицию, содержащую соединение, выбранное из группы, состоящей из:

- a) ингибитора BACE;
- b) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении тау-белка;
- c) соединения, применимого в активной или пассивной иммунотерапии в отношении A β -пептида;
- d) антагонистов NMDA-рецептора;
- e) дополнительного ингибитора агрегации тау-белка;
- f) ингибитора ацетилхолинэстеразы;
- g) противоэпилептического средства;
- h) противовоспалительного лекарственного средства и
- i) антидепрессанта.

109. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный ингибитор BACE1 представляет собой низкомолекулярный ингибитор BACE I, выбранный из группы, состоящей из LY2886721, MK-8931, AZD3293 или E2609.

110. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный ингибитор BACE1 представлен формулой I

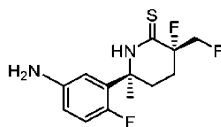


где Ag выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиазанила, имидазолила, пиазолила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, и при этом Ag необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси;

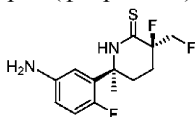
R₁ представляет собой одно или несколько из водорода, галогена, C₁-C₃фторалкила или C₁-C₃алкила и

R₂ представляет собой водород или фтор.

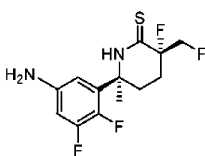
111. Композиция, способ или набор по п.110, где соединение формулы I выбрано из группы, состоящей из



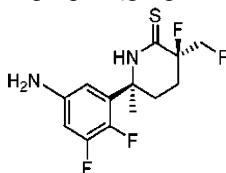
(3S,6S)-6-(5-амино-2-фторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тиона,



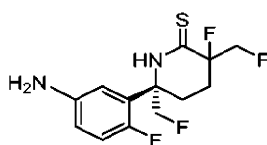
(3R,6S)-6-(5-амино-2-фторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тиона,



(3S,6S)-6-(5-амино-2,3-дифторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тиона,

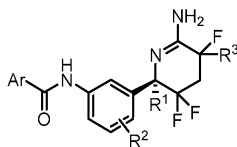


(3R,6S)-6-(5-амино-2,3-дифторфенил)-3-фтор-3-(фторметил)-6-метилпиперидин-2-тиона,



(6S)-6-(5-амино-2-фторфенил)-3-фтор-3,6-бис(фторметил)пиперидин-2-тиона.

112. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный ингибитор BACE1 представлен формулой II



Формула II,

где Ag выбран из группы, состоящей из фенила, пиридила, пиримидила, пиазанила, имидазолила, пиазолила, 1,2,4-триазолила, тиюфенила, тиазолила, оксазолила, изоксазолила, 1,3,4-тиадиазолила, изотиазолила, 1,3,4-оксадиазолила, 1,2,4-оксадиазолила, фуразанила и 1,2,4-тиадиазолила, и при этом Ag необязательно замещен одним или несколькими из галогена, CN, C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила, C₂-C₆алкинила, C₁-C₆фторалкила или C₁-C₆алкокси;

R₁ представляет собой C₁-C₃алкил или C₁-C₃фторалкил;

R₂ представляет собой водород, галоген, C₁-C₃фторалкил или C₁-C₃алкил и

R₃ представляет собой C₁-C₃алкил.

113. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный ингибитор BACE1 выбран из группы, состоящей из: N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-фторпиколинамида; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиразин-2-карбоксамид; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-метоксипиколинамида; N-(3-((2R,5S)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-циано-3-метилпиколинамида и N-(3-((2R,5R)-6-амино-3,3,5-трифтор-2,5-диметил-2,3,4,5-тетрагидропиридин-2-ил)-4-фторфенил)-5-(диформетил)пиразин-2-карбоксамид.

114. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный антагонист NMDA-рецептора выбран из группы, состоящей из мемантина, наменды, намзарики (мемантин/донепезил) и их генерических форм.

115. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный ингибитор ацетилхолин-трансферазы выбран из группы, состоящей из донепезила, галантамина и ривастигмина.

116. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108, где указанный антидепрессант выбран из группы, состоящей из эсциталопрама, сертралина, циталопрама, пароксетина, флуоксетина, венфлак-сина, тразодона, миртазапина, вортиоксетина и их генерических форм.

117. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108 для применения в лечении таупатии, выбранной из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), психоза, в частности психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD, психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), лобно-височной деменции (FTD или ее вариантов), TBI (травматического повреждения головного мозга, острой или хронической форм), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни Пика, первичной возрастной таупатии (PART), сенильной деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, деменции боксеров, хронической травматической энцефалопатии, инсульта, восстановления после инсульта, нейродегенерации, связанной с болезнью Паркинсона, паркинсонизма, сцепленного с хромосомой, болезни Литико-Бодига (гуамского комплекса паркинсонизм-деменция), ганглиоглиомы и ганглиоцитомы, менингиоангиоматоза, постэнцефалитического паркинсонизма, подострого склерозирующего панэнцефалита, болезни Хантингтона, свинцовой энцефалопатии, туберозного склероза, болезни Галлервордена-Шпатца и липофусциноза.

118. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108 для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения, диагностики или визуализации таупатии.

119. Композиция по п.106, способ по п.107, набор по п.108 для лечения болезни Альцгеймера, болезни аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), кортикобазальной дегенерации (CBD), психоза, обусловленного AD, или психоза у пациентов с AD и психиатрических симптомов у пациентов с деменцией с тельцами Леви.

Примеры

Пример 1. Иммунизация мышей тау-пептидами, фосфорилированными в 396/404

Мышей C56/BL6 и FVB иммунизировали с использованием 10 мкг фосфорилированного тау-пептида 386-408 (pS396/pS404) (SEQ ID NO: 2), конъюгированного с P30, составленного в адъюванте TiterMax.

Мыши были самками и самцами из линий C56/BL6 и FVB. Мышей в возрасте 2-3 месяцев иммунизировали фосфорилированным тау-белком 386-408, конъюгированным с пептидным эпитопом P30.

Иммуногенный фосфорилированный пептид тау-белка 386-408 (pS396/pS404), конъюгированный с P30, составляли в TiterMax (400 мкг/мл пептида в смеси 1:1 об.:об.) согласно протоколу поставщика TiterMax, и мышам подкожно инъецировали 20 мкг антигенного пептида (100 мкл). Контрольным мышам инъецировали только адъювант. Всех мышей, иммунизированных пептидом, подвергали повторной иммунизации с помощью 0,5 мкг пептида/TiterMax (10 мкг/мл пептида, составленного согласно описанному выше и инъецированного) с интервалами в месяц. В заключение мышей подвергали повторной иммунизации с помощью фосфорилированного тау-белка 386-408 (pS396/pS404), конъюгированного с P30, без TiterMax за 3 дня до сбора спленоцитов с последующим слиянием спленоцитов с клетками SP-2. Полученные первичные гибридомы отбирали для циклов повторного клонирования после того, как они проявляли положительное связывание с фосфорилированным тау-белком 386-408 (pS396/pS404), что выявляли с помощью ELISA, и проявляли активность предпочтительного связывания с антигенами S1 и P3 из лизатов головного мозга от субъектов с AD и TG4510 (как описано ниже в примере 2B). Такое связывание сравнивали с активностью связывания таких антител, наблюдаемой в лизатах головного мозга от контрольных субъектов, с помощью дот-блот-анализов и планшетов для ELISA или MSD, покрытых лизатом головного мозга.

Пример 2A. Получение гибридомы

Мышей подвергали повторной иммунизации с помощью фосфорилированного тау-белка 386-408 (pS396/pS404), конъюгированного с P30, без TiterMax за 3 дня до сбора селезенки у мышей-репондеров с последующим слиянием спленоцитов с клетками SP-2. Гибридомы отбирали для циклов повторного клонирования после выявления с помощью ELISA положительного связывания с фосфорилированным

тау-белком 386-408 (pS396/pS404) и проявления активности предпочтительного связывания с антигенами S1 и P3 из лизата головного мозга от субъектов с AD и TG4510 по сравнению с лизатом головного мозга от контрольных субъектов с помощью дот-блот-анализов и планшетов для ELISA или MSD, покрытых лизатом головного мозга.

Пример 2В. Вестерн-блот-анализ и дот-блот-анализ специфичных антител

Биохимическое фракционирование тау-белка

Ткани головного мозга людей или мышей rTg4510, сверхэкспрессирующие человеческий тау-белок с мутацией P301L, гомогенизировали в 10 объемах Tris-солевого буферного раствора, содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз, как указано далее: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 274 mM NaCl; 5 mM KCl; 1% смесь ингибиторов протеаз (Roche); 1% смесь ингибиторов фосфатаз I и II (Sigma) и 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF; Sigma). Гомогенаты центрифугировали при 27000×g в течение 20 мин при 4°C с получением фракций надосадочной жидкости (S1) и осадка. Образцы осадка повторно гомогенизировали в 5 объемах буфера с высокой концентрацией солей/сахарозы (0,8 M NaCl, 10% сахароза, 10 mM Tris/HCl, [pH 7,4], 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) и центрифугировали согласно описанному выше. Образцы надосадочной жидкости собирали и инкубировали с саркозилем (конечная концентрация 1%; Sigma) в течение часа при 37°C с последующим центрифугированием при 150000×g в течение одного часа при 4°C с получением образцов нерастворимого в саркозиде осадка, называемых в данном документе фракцией P3. Осадок P3 ресуспендировали в буфере TE (10 mM Tris/HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) до объема, равного половине исходного объема, используемого для гомогенатов головного мозга.

Вестерн-блот- и дот-блот-анализы

Фракционированные экстракты тканей S1 и P3 растворяли в SDS-буфере для образцов, содержащем 0,1 M DTT. Подвергнутые тепловой обработке образцы (95°C в течение 10 мин) разделяли с помощью гель-электрофореза в 4-12% Bis-Tris-гелях для SDS-PAGE (Invitrogen) и переносили на мембраны из PVDF (BioRad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Образцы для дот-блоттинга наносили пятнами непосредственно на нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, Питтсбург, Пенсильвания) в известных концентрациях для всех образцов. Мембраны как для вестерн-блоттинга, так и для дот-блоттинга блокировали в 5% обезжиренном сухом молоке в TBS-Tween (0,5%) с pH 7,4 с последующим инкубированием с 1 мкг/мл C10-2 в течение ночи при 4°C. Мембраны промывали и инкубировали с антителом к мышинному IgG, конъюгированным с пероксидазой (1:5000; Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания). Связанные антитела выявляли с помощью системы усиленной хемилюминесценции (набор ECL PLUS; PerkinElmer). Количественную оценку и визуальный анализ иммунореактивности в рамках вестерн-блоттинга и дот-блоттинга выполняли с помощью подключенной к компьютеру биовизуализационной аналитической системы LAS-4000 (Fujifilm, Токио, Япония) и программного обеспечения Multi Gauge v3.1 (Fujifilm). Белковую нагрузку корректировали по объему исходных фракций, и ее можно преобразовать в исходную сырую массу ткани.

Пример 3. Жидкофазный анализ ингибирования захвата антигенов P3 из материала от субъектов с AD

Пример 3А.

Цель: Выполнить количественную оценку ингибирования связывания антигенов тау-белка pS396 из материала головного мозга P3 от субъектов с AD с мышинным C10.2 с помощью человеческого C10-2 и подвергнутых мутации вариантов. Планшеты MSD, покрытые мышинным C10-2 перед инкубацией с P3 из материала от субъектов с AD или P3 из материала от субъектов с AD, предварительно инкубировали с вариантами C10.2, представляющими интерес. Степень ингибирования представляли в виде значений IC_{50} , отражающих кажущуюся аффинность связывания антитела в жидкой фазе с антигенами. Значения IC_{50} получали с помощью аппроксимации к модели односайтового или двухсайтового связывания с применением программного обеспечения Graph Pad Prism. Антитело отрицательного контроля (мышинное C10-1), реактивное в отношении P (404) тау-белка, добавляли для сравнения (данные не показаны).

Способ. Планшеты MSD покрывали захватывающим антителом (750 нг/мл мышинного C10-2 в карбонатном буфере, pH 8,5) в течение ночи при комнатной температуре с последующим блокированием (30 мин. в PBS, 3% BSA, 0,1% NP40) и 5-кратным промыванием (PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP40). Антитела в ступенчато изменяющейся концентрации (0-1000 нМ) инкубировали в течение 60 мин с материалом P3 от субъектов с AD при комнатной температуре и затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в планшетах MSD, покрытых мышинным C10-2, как описано выше. Планшеты промывали 5 раз (PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP40) и антитело к общему тау-белку (MSD, меченое SULFO-TAG, 1:50) добавляли для выявления захваченного тау-белка, которое отражало неподвергнутые ингибированию свободные антигены тау-белка.

Результаты. Данные показывали дозозависимое ингибирование захвата тау-белка с помощью человеческого C10-2 и вариантов (фиг. 1). Варианты C10-2_N32S и C10-2_N32S:A101T демонстрировали более выраженное ингибирование (IC_{50} = 44 и 14 нМ соответственно, что соответствует модели односайтового связывания), тогда как C10-2 характеризовалось неоднородным ингибированием, что отражалось наилучшим соответствием модели двухсайтового связывания (IC_{50} 14 нМ/630 нМ). Низкоаффинное свя-

зывание ($IC_{50} = 630$) было преобладающим, поскольку высокоаффинное связывание антитела ($IC_{50} = 14$ нМ) составляло менее 25% от общего связывания. Результаты показаны на фиг. 1.

Пример 3В.

Цель: Выполнить количественную оценку ингибирования связывания пептидов 386-408 тау-белка pS396 с помощью человеческого C10-2 и подвергнутых мутации вариантов в жидкофазном анализе ингибирования. Степень ингибирования представляли в виде значений IC_{50} , отражающих кажущуюся аффинность связывания антитела. Значения IC_{50} получали с помощью аппроксимации к модели односайтового или двухсайтового связывания с применением программного обеспечения Graph Pad Prism. Антитело отрицательного контроля (мышинное C10-1), реактивное в отношении Р (404) тау-белка, добавляли для сравнения (данные не показаны).

Способ. Планшеты MSD покрывали пептидом 386-408 тау-белка pS396 в карбонатном буфере, pH 9,5, в течение ночи при комнатной температуре с последующим блокированием (30 мин в PBS, 3% BSA, 0,1% NP40) и 5-кратным промыванием (PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP40). Тау-белок 386-408 pS396 в ступенчато изменяющейся концентрации (0-1000 нМ) инкубировали в течение 60 мин с 1 нг/мл антитела при комнатной температуре и затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в планшетах MSD, покрытых тау-белком 386-408 pS396, как описано выше. Планшеты промывали 5 раз (PBS, 0,1% BSA, 0,1% NP40) и антитело к общему тау-белку (MSD, меченое SULFO-TAG, 1:50) добавляли для выявления связанного антитела, которое отражало неподвергнутое ингибированию свободное антитело. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 4. Иммуногистохимическое профилирование антител

Ткани

Мышь. Ткани головного мозга мышей собирали от 8-месячных мышей rTg4510. Эти трансгенные мыши экспрессируют человеческий мутантный тау-белок (P301L 0N4R) под контролем элемента ответа Tet-Off в CamK2-положительных нейронах и характеризуются выраженным гиперфосфорилированием тау-белка и образованием клубков, начиная с возраста 6 месяцев и далее. Нетрансгенные одноплетные животные выступали в качестве контролей. Образцы головного мозга мышей фиксировали путем погружения в 4% параформальдегид и заливали в парафин.

Человек. Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы лобной доли коры головного мозга человека приобретали у Tissue Solutions (Глазго, Великобритания). Ткани от 3 доноров с диагностированной конечной стадией болезни Альцгеймера (AD; V-VI стадия по Braak) сравнивали с тканью от не пораженного деменцией контрольного донора в соответствующей возрастной группе.

Иммуногистохимическое исследование

Срезы толщиной четыре мкм из тканей мыши и человека нарезали на микротоме, депарафинировали и подвергали демаскированию антигена путем микроволновой обработки срезов в 10 mM цитратном буфере, pH 6, в течение 10 мин. Эндогенную пероксидазу блокировали с помощью 1% пероксида водорода, а затем 5% нормальной свиной сыворотки крови в PBS, 1% BSA, 0,3% Triton X-100 (PBS-BT). Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с антителами hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T, разбавленными в PBS-BT в диапазоне концентраций, указанных на фиг. 1. Срезы промывали в PBS, 0,25% BSA, 0,1% Triton X-100 перед инкубированием с биотинилированным вторичным свиным антителом к человеческим иммуноглобулинам (№B1140; Sigma-Aldrich) при 1:200 в течение 1 ч. После дополнительного промывания применяли набор для образования комплекса стрептавидин-биотин (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния) и наконец иммунореактивность визуализировали с помощью 0,05% диаминбензидина. Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином с выявлением локализации ядер.

Результаты

В 3 образцах головного мозга от субъектов с AD hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T метили структуры, соответствующие патологическому тау-белку (т. е. клубки, нити нейропиля, дистрофические нейриты). Степень иммунореактивности была зависимой от концентрации. Например, видимого мечения глиальных клеток или сосудов не выявляли. В срезах из контрольного образца головного мозга иммунореактивность не выявляли. Аналогичным образом, все 3 антитела приводили к появлению предполагаемого паттерна в отношении фосфорилированного тау-белка как в гиппокампе, так и в коре головного мозга из образцов головного мозга rTg4510. В срезах головного мозга от нетрансгенных мышей иммунореактивности не выявляли.

Пример 5. Окрашивание структур, содержащих тау-белок, у мышей rTg4510 после i.v. инъекции

Способ:

Десятимесячные мыши rTg4510. Эти трансгенные мыши экспрессируют человеческий мутантный тау-белок (P301L 0N4R) под контролем элемента ответа Tet-Off в CamK2-положительных нейронах и характеризуются выраженным гиперфосфорилированием тау-белка и образованием клубков, начиная с возраста 6 месяцев и далее. Кроме того, у мышей rTg4510 возрастом 10 месяцев присутствует нейродегенерация в областях с выраженной патологией. Трансгенные по одному гену одноплетные животные rTA выступали в качестве контролей. Мыши получали однократную инъекцию в хвостовую вену антител hC10-2, hC10-2_N32S или hC10-2_N32S_A101T при концентрации 80 мг/кг. Каждой мыши проводили

инъекцию в объеме 150 мкл. Через три дня после инъекции мышей перфузировали в течение 2 мин с помощью PBS с последующей перфузией в течение 10 мин с помощью 4% параформальдегида. Образцы головного мозга подвергали криозащите в 30% сахарозе и нарезали на свободно плавающие криосрезы толщиной 40 мкм. Срезы инкубировали с 5% нормальной свиной сывороткой крови в PBS/1% BSA/0,3% Triton X-100 в течение 20 мин, промывали в PBS и наконец инкубировали с конъюгированным с AlexaFluor488 вторичным антителом к IgG человека при 1:200 (№ 709-545-149; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест Гров, США). Для окрашивания ядер применяли Hoechst. Срезы промывали в PBS, монтировали на предметное стекло и исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты

I.v. инъекция hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T приводила к связыванию *in vivo* с целевыми структурами в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга животных гTg4510 соответствующего возраста (фиг. 4-7). Число наблюдаемых положительных структур варьировало между отдельными животными гTg4510. У контрольных мышей tTA специфичных флуоресцентных сигналов после инъекции любого из трех антител не выявляли (фиг. 4-7).

Выступавшая в качестве отрицательного контроля инъекция контрольного IgG человека не приводила к появлению сигналов у мышей гTg4510 (данные не показаны). Положительные сигналы в образцах головного мозга гTg4510 было нелегко выявить как внутриклеточный окрашенный материал, и они могли представлять собой внеклеточный материал тау-белка, высвобождаемым во время процесса нейродегенерации. В совокупности эти данные позволяют предположить, что антитела hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T способны проникать в паренхиму головного мозга и специфично окрашивать мишени у мышей гTg4510 *in vivo*.

Пример 6. Определение характеристики иммунореактивности тау-белка в образцах головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера

Ткани

Залитые в парафин образцы лобной доли коры головного мозга человека приобретали у Tissue Solutions (Глазго, Великобритания). Включали ткани от доноров с диагностированной конечной стадией болезни Альцгеймера (AD; V-VI стадия по Braak).

Иммуногистохимическое исследование

Срезы толщиной четыре мкм из тканей человека нарезали на микротоме, депарафинировали и подвергали демаскированию антигена путем микроволновой обработки срезов в 10 mM цитратном буфере, pH 6, в течение 10 мин. Срезы инкубировали с 5% нормальной свиной сывороткой крови в PBS, 1% BSA, 0,3% Triton X-100 (PBS-BT) с последующим инкубированием в течение ночи при 4°C с антителами hC10-2 или hC10-2_N32S_A101T, разбавленными в PBS-BT. Срезы промывали в PBS, 0,25% BSA, 0,1% Triton X-100. Иммунореактивность визуализировали с помощью конъюгированного с AlexaFluor488 вторичного антитела к IgG человека (1:200; № 709-545-149, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест Гров, США). В случае двойной иммунофлуоресценции срезы совместно инкубировали с AT8 (1:500; № MN1020, ThermoFisher, Вальтман, США) или антителом к общему человеческому тау-белку E1, изготовленным по индивидуальному заказу кроличьим антителом, индуцированным против N-концевого фрагмента тау-белка 19-33 (Crowe et al., 1991). Иммунореактивности AT8 и E1 визуализировали соответственно с помощью конъюгированного с AlexaFluor568 антитела к мышинному антителу (1:400; № A10037, ThermoFisher) и конъюгированного с AlexaFluor568 антитела к кроличьему антителу (1:400; № A10042, ThermoFisher). Срезы анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты

В срезах с AD, подвергнутых двойному окрашиванию в отношении N-концевого фрагмента общего тау-белка и тау-белка pS396, популяцию нейронов, содержащих клубки, метили как E1, так и антитела hC10-2 либо hC10-2_N32S_A101T (фиг. 7). Ряд клубков тау-белка метили только антитела hC10-2 либо антитела hC10-2_N32S_A101T (фиг. 7, стрелки). Ранее было показано, что внеклеточный тау-белок (не поддающийся выявлению клубки) не окрашивается антителами к N-концевому фрагменту тау-белка (например, Bondareff et al., 1990; Braak et al., 1994; Flores-Rodriguez et al., 2015). Таким образом, молекулы тау-белка, меченые антителами hC10-2 или hC10-2_N32S_A101T в отдельности, вероятно, представляют внеклеточные не поддающиеся выявлению клубки.

Вестерн-блот-анализы и иммунопреципитация

Процедура эксперимента и описание эксперимента

Использовали трансгенных мышей гTg4510: кДНК человеческого тау-белка с мутацией P301L (4R0N TauP301L) помещали ниже конструкции тетрациклинового оперона-респондера (TRE). Для активации трансгена респондер должен совместно экспрессироваться с конструкцией активатора, состоящей из тетрациклиновой системы условной экспрессии гена (tTA). Систему активатора tTA помещали ниже промотора CaMKII α , ограничивая таким образом экспрессию TRE главным образом в структурах переднего мозга. Респондер трансгена тау-белка экспрессировали в линии мышей FVB/N (Taconic), а систему активатора tTA поддерживали в линии мышей 129S6 (Taconic). Их потомство F1 несло трансгены респондера и активатора (гTg4510) наряду с нетрансгенными (отличными от Tg) и трансгенными по одному гену одноплетными мышами. Для экспериментов использовали только мышей F1. Всех мышей скре-

щивали в Taconic, Дания, и генотипировали с помощью анализа ДНК из хвоста с применением пар праймеров $5'-\text{GATTAAACAGCGCATTAGAGCTG}-3'$ и $5'-\text{GCATATGATCAATTCAAGGCCGATAAG}-3'$ для трансгена активатора tTA и $5'-\text{TGAACACAGGATGGCTGAGCC}-3'$ и $5'-\text{TTGTCATCGCTTCCAGTCCCCG}-3'$ для трансгена респондера мутантного тау-белка. Мышей содержали в группах, и они получали воду и пищу (Брогаарден, Дания) в неограниченном доступе, а также вещества с добавками. Цикл свет/темнота составлял 12 ч; комнатная температура составляла $21 \pm 2^\circ\text{C}$, и относительная влажность составляла $55\% \pm 5\%$. Эксперименты выполняли согласно законодательству Дании об экспериментальных животных (лицензия № 2014-15-0201-00339).

Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков в целях сохранения метаболического окружения головного мозга и предупреждения появления артефактов, которые могли изменить биохимические профили тау-белка. Образцы головного мозга мышей разрезали саггитально вдоль срединной линии с получением двух полушарий. Кору головного мозга и гиппокамп правого полушария от каждого животного подвергали быстрой заморозке на сухом льду и хранили при -80°C до применения. Замороженные образцы коры человеческого головного мозга от пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) и здоровых контрольных (HC) доноров соответствующего возраста приобретали в Tissue Solution (Глазго, Великобритания). Образцы человеческого головного мозга характеризовались аналогичным временем после смерти обработки, составляющим < 6 ч, и на них проводили определение характеристик в отношении патологии амилоида и тау-белка, и выбранные образцы от субъектов с AD классифицировали как соответствующие стадиям V-VI по Braak.

Для иммунопреципитации тау-белка из лизатов головного мозга применяли набор для иммунопреципитации с помощью поперечного связывания (Thermo Fisher Pierce 26147) согласно инструкциям производителя. Вкратце, антитело связывали с белком A/G совместно с агарозой с последующим поперечным связыванием связанного антитела с DSS (дисукцинимидилсубератом). Гомогенат головного мозга получали в буфере Tris (25 mM Tris/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA и полная смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) и предварительно очищали в течение ночи при 4°C с контрольной агарозной смолой. Предварительно очищенный лизат инкубировали со смолой с поперечно связанным антителом в течение ночи при 4°C с последующим элюированием антигена с помощью 50 мкл буфера для элюирования (pH 2,8) и сразу же центрифугировали в пробирки для сбора образцов, содержащие 5 мкл 1 M Tris, pH 9,5. Иммунопреципитированный тау-белок растворяли в SDS-буфере для образцов, содержащем дитиотреитол (DTT, 100 mM), подвергали тепловой обработке (95°C в течение 10 мин) и подвергали вестерн-блоттингу, описанному ниже.

Концентрации человеческого тау-белка измеряли в гомогенатах головного мозга и предварительно очищенных лизатах с помощью ELISA для общего человеческого тау-белка согласно инструкциям производителя (Invitrogen).

Ткани гомогенизировали в 10 объемах Tris-солевого буферного раствора (TBS), содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз, как указано далее: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 274 mM NaCl; 5 mM KCl; 1% смесь ингибиторов протеаз (Roche); 1% смесь ингибиторов фосфатаз I и II (Sigma) и 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF).

Гомогенаты центрифугировали при $27000 \times g$ в течение 20 мин при 4°C с получением фракций надосадочной жидкости (S1) и осадка. Образцы осадка повторно гомогенизировали в 5 объемах буфера с высокой концентрацией солей/сахарозы (0,8 M NaCl, 10% сахароза, 10 mM Tris/HCl, [pH 7,4], 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) и центрифугировали согласно описанному выше. Образцы надосадочной жидкости собирали и инкубировали с саркозилем (конечная концентрация 1%; Sigma) в течение одного часа при 37°C с последующим центрифугированием при $150000 \times g$ в течение 1 ч при 4°C с получением экстрагируемых в солевом растворе и саркозиле (S3) и нерастворимых в саркозиле (P3) фракций. Осадок P3 ресуспендировали в буфере TE (10 mM Tris/HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) до объема, равного половине исходного объема, используемого для гомогенатов головного мозга. Для обогащения фракций S1 молекулами гиперфосфорилированного тау-белка часть фракции S1 отделяли путем дополнительного центрифугирования при $150000 \times g$ в течение 20 мин с получением фракций надосадочной жидкости (S1s) и осадка (S1p). Осадок S1p повторно суспендировали в буфере TBS до объема, равного одной пятой используемого исходного объема S1. Фракционированные экстракты тканей S1, S1p и P3 растворяли в SDS-буфере для образцов, содержащем DTT (100 mM). Подвергнутые тепловой обработке образцы (95°C в течение 10 мин) разделяли с помощью гель-электрофореза в 4-12% Bis-Tris-гелях для SDS-PAGE (Invitrogen) и переносили на мембраны из PVDF (BioRad Laboratories, Геркулес, Калифорния). После блокирования блокирующим раствором, содержащим 5% обезжиренное молоко и 0,1% Triton-X100 в TBS, мембраны инкубировали с 1 мкг/мл hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T или кроличьим антителом к тау-белку pS396 (Invitrogen). Мембраны промывали и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой антителами к IgG человека или антителами к кроличьим антителам (1:5000; Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания). Связанные антитела выявляли с помощью системы усиленной хемилюминесценции (набор ECL PLUS; Perkin Elmer). Количественную оценку и визуальный анализ иммунореактивности в рамках вестерн-блоттинга выполняли с помощью подключенной к компьютеру биовизуализационной аналитической системы LAS-4000 (Fujifilm, Токио, Япония) и программного обеспечения Multi Gauge v3.1.

(Fujifilm). Для выявления тау-белка загружали примерно 2 мкг S1 от мыши, 20 мкг S1 из образцов человеческого головного мозга и равные объемы различных фракций (S1, S1p и P3) с выполнением SDS PAGE.

Выявление патологического тау-белка с помощью вестерн-блоттинга

Объединенные гомогенаты головного мозга от трех 32-недельных мышей rTg4510 и таковые от не-трансгенных (отличных от Tg) контрольных одноплетных животных и объединенные образцы коры головного мозга от четырех доноров с AD и таковые от четырех здоровых контрольных (HC) доноров разделяли на растворимую (S1) фракцию, фракцию растворимого в TBS осадка (S1p) и нерастворимую в саркозиле (P3) фракцию. hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T использовали при концентрации 1 мкг/мл в вестерн-блоттинге и выявляли патологический тау-белок в образцах от мышей rTg4510 и субъектов с AD. Авторы настоящего изобретения наблюдали выявление тау-белка размером 55 и 64 кДа в S1 и тау-белка размером 64 и 70 кДа во фракциях P3 и S1p от 32-недельных мышей rTg4510. Кроме того, наблюдали три полосы усеченного тау-белка размером < 50 кДа во фракции P3. Сигнал не выявляли в S1p и P3 от отличных от Tg контрольных одноплетных животных, не экспрессирующих человеческий трансгенный тау-белок. Во фракции S1 от отличных от Tg мышей выявляли слабый сигнал, соответствующий молекуле размером около 50 кДа, которая, наиболее вероятно, представляла эндогенный мышечный тау-белок, фосфорилированный по остатку S396 (фиг. 8А-8С). Подводя итог, можно отметить, что hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T обеспечивали выявление тау-белка pS396, а также как нормальные фосфорилированные молекулы тау-белка размером 55 кДа, так и гиперфосфорилированные молекулы тау-белка размером 64 кДа в образцах от мышей rTg4510. Наиболее сильный сигнал наблюдали в случае hC10-2_N32S_A101T.

Во фракциях S1, S1p и P3 от доноров с AD hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T обеспечивали выявление типичного для AD пятна тау-белка и четыре паттерна полос патологического тау-белка (тау-белок размером 54, 64, 69 и 74 кДа). Как и ожидалось, нерастворимые в саркозиле молекулы гиперфосфорилированного тау-белка, выделенные из фракции P3, были наиболее выраженными, за ними следовали растворимые молекулы гиперфосфорилированного тау-белка, обогащенные во фракции S1p. Во фракциях P3 от здорового контроля (HC) сигнал не выявляли. Во фракциях S1 и S1p от HC выявляли слабый сигнал, соответствующий молекуле размером около 55 кДа, которая, вероятно, представляла нормальный тау-белок, фосфорилированный по остатку S396 (фиг. 8А-8С). Подводя итог, можно отметить, что hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T обеспечивали выявление типичного пятна тау-белка, характерного для AD, и четыре паттерна полос патологического тау-белка, представляющие гиперфосфорилированный тау-белок. Наиболее сильный сигнал наблюдали в случае hC10-2_N32S_A101T.

Иммунопреципитация патологического тау-белка

Для определения способности hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T к связыванию с тау-белком в неденатурирующих условиях устанавливали протокол иммунопреципитации (IP) тау-белка, в котором антитела к тау-белку ковалентно связываются посредством образования поперечной связи с белком A/G смолы и тем самым обеспечивают отсутствие контаминации антителами при IP. В случае анализа тау-белка с помощью SDS-PAGE присутствие тяжелых цепей антитела, применяемого для IP, может нарушать сигналы, поскольку оба белка выявляют с размером около 50 кДа. Исследовали эффективность hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T в отношении снижения содержания патологического тау-белка из человеческого головного мозга. В качестве антигена использовали 500 мкг предварительно очищенного лизата из гомогенатов головного мозга, объединенных от четырех доноров с AD, и таковых от HC доноров, содержащих соответственно 0,1 мкг и 0,15 мкг человеческого тау-белка (определенного с помощью ELISA для человеческого тау-белка). hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T (10 мкг) обеспечивали снижение содержания молекул тау-белка размером 54, 64, 69 и 74 кДа (четыре полосы патологического тау-белка) и пятно, характерное для AD, из предварительно очищенных гомогенатов от субъектов с AD (соотношение антиген/Ab 1:100), визуализированные с помощью поликлонального кроличьего антитела к тау-белку pS396 (фиг. 9). Сравнивая интенсивность полос тау-белка из образцов головного мозга от субъектов с AD, которая снижалась с помощью hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T, с таковой в случае контрольного антитела к IgG человека и головного мозга HC, можно подвести итог, что hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T обеспечивали иммунопреципитацию тау-белка, гиперфосфорилированного по участку pS396, исключительно в образцах головного мозга от субъектов с AD и были эффективными при соотношении антиген/антитело 1:100.

Клеточный анализ и анализ агрегации

Клетки HEK293 транзигентно трансфицировали человеческим тау-белком-P301L-FLAG в 6-луночных планшетах через 24 ч после высевания, после чего через 24 ч их инкубировали с гомогенатом головного мозга в течение 24 ч с последующим разделением и пересеванием клеток и сбором через дополнительные 24 ч. Клетки лизировали и подвергали ультразвуковой обработке в TBS, дополненном буфером, содержащим 1% Triton X, Phos-stop и ингибиторы фосфатаз и протеаз complete (Roche), и подвергали ультрацентрифугированию при 100000×g в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в SDS, подвергали ультразвуковой обработке и ультрацентрифугированию в течение 30 мин при 100000×g. Об-

разцы надосадочной жидкости анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Клетки, экспрессирующие человеческий тау-белок P301L, продемонстрировали наличие нерастворимого (фракция SDS, выявление с помощью E1/FLAG) гиперфосфорилированного (выявление по pS396) тау-белка при затравке с помощью общих гомогенатов головного мозга от трансгенных по тау-белку мышей rTg4510.

Клетки, обработанные гомогенатом контрольного головного мозга мышей tTA, продемонстрировали отсутствие агрегированного гиперфосфорилированного человеческого тау-белка. Дополнительно, общие клеточные лизаты клеток HEK293 анализировали с помощью анализа агрегации тау-белка от Cis-bio. В основе этого анализа лежит флуоресценция с временным разрешением с применением одного и того же антитела в качестве как донорного (конъюгированного с Tb3+), так и акцепторного (конъюгированного с d2) Ab в FRET. Образец объемом 10 мкл смешивали со смесью антител объемом 10 мкл и инкубировали в течение 20 ч. Планшет прочитывали на планшет-ридере PHERAstar для оценки флуоресценции с временным разрешением (измеренного/интегрированного после включения возбуждающего света сигнала FRET). В анализе измеряют уровень агрегированного тау-белка как в человеческом секционном материале, так и у мышей rTg4510 и в клетках HEK с затравкой с высокой специфичностью и чувствительностью. Результаты показаны на фиг. 10.

Пример 7. Иммуноистощение по тау-белку

Экстракты головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера получали из замороженных образцов префронтальной коры головного мозга, взятых посмертно, в 10× объеме стерильного холодного PBS. Ткань гомогенизировали с применением ножевого гомогенизатора с последующей ультразвуковой обработкой в режиме выходной мощности 2 с импульсами 5×0,9 с (ультразвуковой дезинтегратор Branson). Затем гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 4°C. Образцы надосадочной жидкости разделяли на аликвоты, подвергали мгновенной заморозке и хранили при -80°C до применения.

25 мкг антитела (гуманизированные варианты C10-2 и 2.10.3, мышинное AT8, mn 1020 от Thermo Scientific) иммобилизовали на магнитных гранулах Dynabeads в 125 мкл суспензии (набор для иммунопреципитации Dynabeads с белком G Novex, № по кат. 10007D). После тщательного промывания покрытые гранулы смешивали с различными количествами непокрытых промытых гранул. Начинали со 100% гранул, покрытых Ab, что соответствовало 5 мкг антитела, со снижением до 100% непокрытых гранул. Общее количество гранул было одинаковым во всех образцах. Гранулы смешивали с 20 мкл экстракта из материала от субъектов с AD и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Магнитные гранулы отделяли от экстракта и экстракты разделяли на аликвоты, подвергали мгновенной заморозке и хранили при -80°C до применения.

Анализ истощения с помощью вестерн-блоттинга

Образцы кипятили в 1× загрузочном SDS-буфере и 100 mM DTT. Объем, соответствующий 3 мкл экстрактов, загружали в 4-12% Bis-Tris-гель NuPAGE (LifeTech, Novex). После электрофореза белки блокировали на мембрану Immobilon-FL из PVDF (0,45 мкм, IPFL10100, Millipore). Мембрану блокировали с помощью блокирующего буфера SEA (№ продукта 37527, Thermo). Уровни тау-белка и P-tau оценивали в образцах с помощью Tau5 (Tau5 представляет собой коммерчески доступное антитело к тау-белку, эпитоп которого, как описано, находится среди аминокислот 210-241 тау-белка. Оно представляет собой мышинное моноклональное к тау-белку. Abeam ab80579, 1:2000), мышинного C10-2 (1 мкг/мл), P-S199/202 (44768G, Invitrogen, 1:1000), P-S422 (ab79415, Abcam, 1:750), человеческого IPN (1 мкг/мл). Gapdh и актин применяли в качестве контролей нагрузки (ab9484, Abeam, 1:2000, A5441, Sigma, 1:20000). Применяли вторичные антитела IgG, конъюгированные с флуорофором (козье антитело к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированное с IRDye 800CW, козье антитело к кроличьим иммуноглобулинам, конъюгированное с IRDye 800CW, козье антитело к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированное с IRDye 680, LI-COR Biosciences), и сигнал оценивали количественно с помощью Odyssey CLx и программного обеспечения Image Studio (LI-COR Biosciences). Проводили количественную оценку отдельных полос, а также сигнала в целых дорожках, и на ее основании строили сигмоидальные кривые зависимости доза-ответ и при наличии возможности оценивали максимальный эффект и значения EC₅₀.

Результаты

Как антитела 2.10.3, так и антитела C10-2 удаляли небольшую долю тау-белка из препарата головного мозга от субъекта с болезнью Альцгеймера. Это указывает на селективность в отношении субпопуляции тау-белка в общем содержании тау-белка. 2.10.3, сконструированное таким образом, чтобы обладать специфичностью к тау-белку pS422, удаляло не более 24% от общего количества тау-белка, тогда как C10-2 удаляло не более 15% общего тау-белка (см. фиг. 11). Это можно интерпретировать так, что субпопуляция pS396 является меньшей субпопуляцией тау-белка, при этом все другие факторы являются равноценными. В качестве альтернативы данные можно интерпретировать так, что антитела C10-2 являются более селективными в отношении pS396, чем антитело 2.10.3 является селективным в отношении pS422.

Как 2.10.3, так и C10-2 удаляли более 90% тау-белка, фосфорилированного по серину-422, хотя количество антитела, необходимое для удаления 50% тау-белка pS422, различалось, при этом для достиже-

ния одного и того же эффекта требовалось 0,42 мкг антитела в случае с 2.10.3 и 0,27 мкг в случае с C10-2 (см. фиг. 12). В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело является специфичным к эпитопу в пределах 386-404, где сериновый остаток 396 человеческого тау-белка является фосфорилированным и где 80% тау-белка pS422 удаляется (в исследованиях по иммуноистощению с использованием вестерн-блот-анализа) при применении менее чем 1 мкг антитела.

C10-2 эффективно удаляло тау-белок, фосфорилированный по серину-396 (максимальный эффект: 88%, и половина этого эффекта достигалась при применении 0,30 мкг антитела). 2.10.3 удаляло меньшую долю тау-белка, фосфорилированного по серину-396 (максимальный эффект: 60%, и половина этого эффекта достигалась при применении 0,63 мкг антитела) (см. фиг. 13). Это указывает на то, что весь тау-белок, фосфорилированный по серину-422, также является фосфорилированным по серину-396, но существует часть гиперфосфорилированного тау-белка, фосфорилированного по серину-396, в которой отсутствует фосфорилированный серин в положении 422. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело является специфичным к эпитопу в пределах 386-404, где остаток 396 человеческого тау-белка является фосфорилированным и где 80% тау-белка pS396 удаляется (в исследованиях по иммуноистощению с использованием вестерн-блот-анализа) при применении менее чем 1 мкг антитела.

Значительная доля тау-белка, удаляемая C10-2, также была фосфорилированной по серину-199/202, поскольку 69% тау-белка, характеризующегося таким фосфорилированием, подвергалось влиянию иммуноистощения (50% эффект при применении 0,34 мкг антитела). Иммуноистощение с помощью 2.10.3 не давало сигмоидальную кривую зависимости доза-ответ для тау-белка pS199/202, хотя при повышении количества антитела наблюдалось снижение интенсивности сигнала (максимальное уменьшение 52% при применении максимального количества антитела (5 мкг) (см. фиг. 14). В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело является специфичным к эпитопу в пределах 386-404, где сериновый остаток 396 человеческого тау-белка является фосфорилированным и где 80% тау-белка P-S199/202 удаляется (в исследованиях по иммуноистощению с использованием вестерн-блот-анализа) при применении менее чем 1 мкг антитела.

Эти результаты указывают на то, что антитело C10-2, нацеливающееся на фосфорилированный серин-396, связывается с более крупным пулом гиперфосфорилированных тау-белков, чем антитело 2.10.3, нацеливающееся на фосфорилированный серин в положении 422.

При исследовании отдельных полос на картине вестерн-блоттинга после иммуноистощения полосу, соответствующую 25 кДа, идентифицировали как молекулу, фосфорилированную по серину-396. Этот фрагмент подвергался иммуноистощению с помощью C10-2, однако 2.10.3 и AT8 не приводили к истощению этого фрагмента (см. фиг. 15). Таким образом, C10-2 характеризуется уникальным свойством удаления этой усеченной формы тау-белка из экстрактов головного мозга от субъектов с болезнью Альцгеймера.

Пример 8. Сравнение вариантов C10-2

Все варианты C10-2 характеризовались одинаковой эффективностью в анализе иммуноистощения (см. фиг. 16). Эти результаты демонстрируют, что введенные мутации не изменяли функциональное связывание с тау-белком, специфичным для головного мозга субъектов с болезнью Альцгеймера.

8а) Обработка антителами у мышей rTg4510 с затравкой

Использовали трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий мутантный тау-белок (P301L0N4R) под контролем элемента ответа Tet-Off в CamK2-положительных нейронах (rTg4510). В этой модели патология тау-белка обычно начинает развиваться в возрасте 3 месяцев, но при скормливания матерям доксициклина во время беременности и в течение первых 3 недель жизни детеныша патология развивается на более поздней стадии (начиная с возраста 6 месяцев). Мышей, предварительно обработанных доксициклином, обрабатывали в течение длительного периода с помощью mC10-2, hC10-2, 2.10.3 или контрольного антитела в дозе 15 мг/кг/неделя, начиная с возраста 2 месяцев. В возрасте 2,5 месяцев экстракт головного мозга от субъекта с болезнью Альцгеймера вводили путем инфузии в гиппокамп. 20 мышей получали анестезию, будучи зафиксированными в стереотаксической рамке, путем вдыхания изофлурана. Череп обнажали и его положение выравнивали, пока брегма и лямбда не расположились на одном уровне. В черепе просверливали отверстие на 2 мм латеральнее (справа) и на 2,4 мм кзади от брегмы. Шприц со скошенным наконечником на 10 мкл (SGE) применяли для инъекции затравочного материала на 1,4 мм вентральнее поверхности головного мозга по вышеуказанным координатам. 2 мкл экстрактов, описанных в примерах 7, вводили путем медленной инфузии в необходимое место (1 мкл/мин), и шприц оставляли на 5 мин перед его извлечением. Рану закрывали швами, и мышей согревали, пока они пробуждались. Мышей содержали в течение 3 месяцев, а затем умерщвляли и подвергали перфузионной фиксации с помощью 4%. Мышей обрабатывали антителом до умерщвления, через 3 месяца после подвергания затравочному действию.

Иммуногистохимическое исследование

Фиксированные образцы головного мозга нарезают на коронарные срезы толщиной 35 мкм при NSA 30 и каждый 6-й срез окрашивали на наличие клубков тау-белка (окрашивание серебром по Gallyas). Положительно окрашенные нейроны (сома) подсчитывали в ипсилатеральной и контралатеральной сторонах гиппокампа всех образцов головного мозга. Были включены все подобласти гиппокампа.

Подсчет проводили в восьми срезах на головной мозг. Результаты отражают суммарное количество положительных нейронов из 8 срезов.

Статистический анализ.

Вариансы значительно различаются при сравнении групп. В связи с этим применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и критерий для множественных сравнений Данна.

Результаты. Экстракты вызвали затравочное действие с формированием патологии клубков в ипсилатеральном гиппокампе. Обработка с помощью mC10-2 значительно снижала патологию клубков в подвергнутом затравочному действию гиппокампе на 57% ($P < 0,05$). Наблюдалась отчетливая тенденция, указывающая на то, что hC10-2 уменьшало патологию. 2.10.3 не характеризовалось таким эффектом (см. фиг. 17).

Пример 8b. Противозатравочные эффекты вариантов C10.2

Цель исследования:

Было высказано предположение, что трансцеллюлярное распространение агрегатов тау-белка способствует развитию патологии и топологическому разнесению болезни Альцгеймера в ЦНС. Были разработаны модели затравочного действия *in vitro*, в которых клеточный человеческий тау-белок, экспрессируемый в клетках HEK293, подвергают затравочному действию патологических агрегатов тау-белка, применяемых внеклеточно. Целью этого исследования была оценка и сравнение терапевтического эффекта моноклонального человеческого антитела C10.2 и вариантов в условиях затравки в парадигме лечения. Термин "затравка" подразумевается как означающий введение такого количества гиперфосфорилированного тау-белка (затравки), которое инициирует гиперфосфорилирование/неправильное сворачивание тау-белка, экспрессируемого в клетках.

Предпосылки, определяющие актуальность исследования

Отложения внеклеточных бляшек A β и наличие парных спиральных филаментов тау-белка внутри нейронов являются характерными признаками болезни Альцгеймера. Внутринейрональные включения тау-белка главным образом состоят из нерастворимых в детергентах гиперфосфорилированных амилонидных форм тау-белка и откладываются у пациентов с AD по пространственно-временному паттерну, указывающем на разнесение агрегатов в ЦНС. Экспериментально было показано, что агрегаты тау-белка распространяются от клеток к клеткам как *in vivo*, так и *in vitro* по прионоподобному механизму. Такое присутствие внеклеточного разнесения, влияющего на распространение заболевания, открывает возможности для иммунотерапии антителами, проникающими в ЦНС.

Было показано, что применение агрегатов/затравок тау-белка приводит к агрегации тау-белка в клетках *in vitro* (Frost et al., 2009, Guo and Lee 2011, Yanamandra et al., 2013). Авторы настоящего изобретения разработали модель затравочного действия *in vitro*, в которой неочищенные гомогенаты головного мозга от мышей Tg4510 (содержащих агрегированный человеческий тау-белок) применяли для затравки человеческого тау-белка 0N4R с мутацией P301L, транзистентно экспрессируемого в клетках HEK293. Важно отметить, что остаточные агрегаты тау-белка (затравки) не могут быть выявлены в контрольных клетках с затравкой pcDNA, поэтому все считываемые показатели выявляют превращение клеточного тау-белка и не выявляют какого-либо сигнала от экзогенного затравочного материала. В данном анализе определяли противозатравочные эффекты различных вариантов hC10.2.

Варианты

Антитело C10-2 (hC10.2)

Антитело N32S (hC10.2 N32S)

Антитело N32Q (hC10.2 N32Q)

Антитело N32S, D55E (hC10.2 N32S D55E)

Антитело N32Q, D55E (hC10.2 N32Q D55E)

Антитело N32S, A101T (hC10.2 N32S A101T)

Эталонный объект(эталонные объекты)

Контрольный hIgG1 (B12)

Тест-система/животные

Клетки HEK293, транзистентно трансфицированные hTau-P301L (0N4R).

Схема эксперимента

Затравочный материал.

Гомогенаты от 12-месячных мышей Tg4510 (и контролей) гомогенизировали в виде 10% гомогенатов в TBS без ингибиторов с помощью гомогенизации с гранулами и подвергали ультразвуковой обработке. Гомогенаты центрифугировали при 21000×g в течение 15 мин и для затравки использовали растворимую фракцию.

Анализ затравочного действия в HEK293.

В данном анализе в 6-луночный планшет высевали 600000 клеток HEK293 на лунку в день 0. В день 1 клетки трансфицировали с помощью 4 мкг плазмидной ДНК с применением 10 мкл липофектамина 2000 согласно протоколу производителя. Среду заменяли через 4 ч. В день 2 клетки подвергали затравочному действию неочищенного гомогената головного мозга от 12-месячных мышей Tg4510 или tTa.

Гомогенаты, содержащие 40 мкг общего белка (примерно 65 нг общего человеческого тау-белка в случае гомогенатов от Tg4510), вносили в среду в каждой лунке. Для экспериментов с обработкой антителами гомогенаты предварительно инкубировали с антителами или без них в течение ночи при 4°C. Через 6 ч после подвергания затравочному действию среду заменяли на среду с низким содержанием сыворотки для снижения клеточной пролиферации и повторно наносили антитела.

В день 3 (через 24 ч после подвергания затравочному действию) клетки трипсинизировали в течение 3 мин для разрушения внеклеточных затравок и повторно высевали по 800000 клеток на лунку в 6-луночные планшеты для экспериментов по фракционированию, по 20000 клеток в 96-луночные планшеты для анализа агрегации тау-белка Cisbio и по 10000 клеток в 96-луночные планшеты для оценки захвата антител с помощью высокопроизводительной визуализации. Антитела повторно наносили в каждую лунку.

Фракционирование клеток

Через 48 ч после подвергания затравочному действию клетки для фракционирования собирали путем соскребания в холодный PBS, осаждали и лизировали в TBS с 1% Triton-X с ингибиторами фосфатаз и протеаз и подвергали ультразвуковой обработке. После ультрацентрифугирования (100000×g в течение 30 мин при 4°C) осадок ресуспендировали в 1% SDS, подвергали ультразвуковой обработке и повторно проводили ультрацентрифугирование. Растворимые в Triton-X и SDS фракции анализировали с помощью вестерн-блоттинга в отношении общего тау-белка (E1) и тау-белка, фосфорилированного по S396 (D1.2). Сигнал D1.2 количественно оценивали с помощью иммунофлуоресценции на устройстве для визуализации Odyssey.

Анализ агрегации тау-белка Cisbio

Через 48 ч после подвергания затравочному действию клетки для анализа агрегации Cisbio промывали в ледяном PBS и подвергали сублимационной сушке. Клетки лизировали в 1% Triton-X с ингибиторами фосфатаз/протеаз и бензоназой (РНКаза и ДНККаза) и инкубировали на орбитальном шейкере при 650 об./мин в течение 40 мин при 4°C. Общий клеточный лизат анализировали в отношении агрегатов тау-белка с помощью анализа агрегации тау-белка Cisbio; в основе данного анализа лежит применение одного и того же антитела, связанного с донором и акцептором, для измерений FRET с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®, Cisbio). Мономерный тау-белок может связываться только с акцепторным либо с донорным антителом, поскольку они являются конкурирующими в отношении одного и того же связывающего эпитопа = FRET отсутствует. В отличие от этого, олигомерный тау-белок может связываться как с донором, так и с акцептором = сигнал FRET. Общий белок определяли во всех образцах с помощью BCA и соотношение сигнал-шум для образца нормализовали по отношению к белку и данные представляли в виде диаграммы относительной агрегации тау-белка с использованием 8 технических повторов.

Захват антитела

Через 48 ч после подвергания затравочному действию планшеты для захвата антитела фиксировали в 4% параформальдегиде и 4% сахарозе и окрашивали с помощью вторичного антитела к человеческим иммуноглобулинам. Захват антитела подтверждали с применением Cellomics.

Анализ данных/статистические данные

Данные представлены в виде объединенных данных от четырех независимых биологических повторов, выполняемых и анализируемых в течение двух различных недель $\pm$ S.E.M. Данные анализировали с помощью однофакторного ANOVA с использованием критерия для множественных сравнений Тьюки, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Результаты

hC10.2 характеризовалось снижающим влиянием в отношении затравочного действия и образования нерастворимого гиперфосфорилированного тау-белка примерно на 40% по сравнению с контролем. Все остальные антитела характеризовались аналогичным или превосходящим эффектом по сравнению с hC10.2. В частности, варианты hC10.2 N32S и N32S_A101T демонстрировали более выраженные эффекты в виде уменьшенной агрегации тау-белка на 45% и 62%. Вариант N32S_A101T демонстрировал значимо более выраженный эффект в отношении агрегации по сравнению с hC10.2.

Пример 8С. Исследования стабильности hC10.2 и вариантов по настоящему изобретению

Цель исследования:

Данное исследование выполняли для оценки основных характеристик стабильности антител по настоящему изобретению, сосредотачиваясь на стрессовых условиях для обнаружения любых потенциальных различий в вариантах.

Схема исследования

Все образцы изначально получали в одинаковых исходных условиях (буфер, концентрация и уровень агрегации). Это позволяет устранить различия в исходных свойствах, которые потенциально могут влиять на последующее проявление поведения образца. Контроль хранили при -80°C и анализировали параллельно с подвергнутыми стрессу образцами (40°C). Образцы убрали из условий 40°C в различные моменты времени и в конце анализировали одновременно с помощью SEC-UPLC, пептидного картиро-

вания с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LCMS) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF).

Варианты

Антитело C10-2 (hC10.2)
 Антитело N32S (hC10.2 N32S)
 Антитело N32Q (hC10.2 N32Q)
 Антитело N32S, D55E (hC10.2 N32S D55E)
 Антитело N32Q, D55E (hC10.2 N32Q D55E)
 Антитело N32S, A101 (hC10.2 N32S A101T)
 Антитело A101T (hC10.2 A101T)
 Антитело D55E (hC10.2 D55E)
 Антитело N32Q, A101T (hC10.2 N32Q A101T)

Эталонный объект

Образцы антител, хранящиеся при -80°C в течение исследования, использовали в качестве эталона.

Вводная информация

Аспекты стабильности моноклонального антитела являются важными как для аспектов изготовления, конечного хранения, так и для составления лекарственного вещества. В данном исследовании авторы настоящего изобретения подвергали антитела стрессу с помощью циклов замораживания-размораживания, воздействия высокой температуры и низкого pH с целью обнаружения того, присутствуют ли явные проблемы в любом из кандидатов.

Материалы и способы

Для исследований по дезамидированию образцы помещали во флаконы при количестве образцов, составляющем 1 мл, и инкубировали при 40°C . В предварительно определенные моменты времени образец переносили в условия -80°C и хранили до проведения анализа.

Исследования по дезамидированию

Дезамидирование остатков Asn исследовали на пептидном уровне с целью получения подробной информации в отношении фактических рассматриваемых остатков. Таким образом, mAb расщепляли с помощью свиного трипсина после восстановления и алкилирования (йодуксусная кислота) с применением стандартных протоколов. Пептиды разделяли на колонке CSHT130 C18 1,7 мкм и вводили в устройство для MS XEVO QTOF (Waters), функционирующее в режиме MSe. Во всех сериях использовали одинаковые параметры. Пептидные карты, полученные с учетом всех моментов времени, анализировали в BioPharmaLynx и количественно оценивали при следующих ограничениях: включали только пептиды, идентифицированные как положительные в отношении дезамидирования, фрагменты, полученные фрагментацией в источнике ионов, не включали. % дезамидирования каждого идентифицированного пептида контролировали в течении некоторого времени.

Краткое изложение способа SEC

Агрегацию определяли с помощью SEC-хроматографии на колонке ACQUITY UPLC® BEH200 SEC 1,7 мкм, $4,6 \times 150$ мм в Acquity UPLC с детектором TUV (Waters). Образцы в объеме 20 мкл, доведенные до 100 мкг/мл (разбавленные в подвижном буфере: PBS Gibco - Invitrogen № 14190-094 + 0,1 M NaCl), вносили в колонку при 0,4 мл/мин, и разделяли в течение 6 мин с помощью изократического элюирования.

Данные анализировали с помощью MassLynx и AUC использовали для количественной оценки уровней агрегации.

Эксперимент с низким значением pH

hC10.2 вносили в колонку с белком G и элюировали при pH 2.8 с использованием стандартных условий. Образец хранили при pH 2,8, и аликвоты удаляли через 0, 15, 30, 60, 120 и 180 мин и нейтрализовали перед обессоливанием в PBS. Образцы анализировали в отношении аффинности связывания, агрегации и дезамидирования.

Определение характеристик hC10.2 в стрессовых условиях.

Дезамидирование в условиях 40°C и 28 дней.

Дезамидирование Asn наблюдали в нескольких незначительных и трех основных участках, охватываемых пептидами LC:T2, HC:T36 и HC:T25. У них уровень дезамидирования увеличивался со временем, при этом составлял соответственно 75%, 38% и 28% в конечной точке. В отличие от пептида HC:T36 и T25, на основании анализа *in silico* (последовательность мотива), предполагалось, что остатки Asn (LC N32 и N34) в пептиде LC:T2 не подвержены дезамидированию, однако неожиданным образом в фактическом эксперименте они явно отличались от других остатков Asn в hC10.2. Увеличенный уровень дезамидирования этого пептида коррелирует со сниженной активностью связывания с дифосфорилированным пептидом и позволяет предположить о механистической связи между дезамидированием и IC₅₀. Данное наблюдение также позволяет предположить, что изменение остатков Asn 32 и/или 34 в LC hC10.2 могло уменьшать уровень дезамидирования в этих участках.

При анализе вариантов отчетливо видно, что простая модификация Asn32 по типу замены либо на

Ser, либо на Gln полностью предотвращает реакцию дезамидирования в Asn34 (фиг. 20). Кроме того, авторы настоящего изобретения не выявляли никакого дезамидирования Gln32 в вариантах с этой мутацией.

Дезамидирование при низком значении pH

В данном исследовании авторы настоящего изобретения анализировали hC10.2 аналогичным образом, как описано выше для исследования стабильности при 40°C. Только в этом случае использовали смесь трипсина и Lys-C (продукт Promega) для оптимизации расщепления лизиновых остатков. Дополнительных участков или степени дезамидирования не наблюдали, и снова наиболее приметными пептидами были LC-T2, HC-T25 и HC-T36. Кроме того, в образцах, подвергнутых обработке при низком значении pH, не наблюдали изменения IC₅₀.

Анализ SEC

Уровень агрегации составлял ниже 3% во всех препаратах, и изменения степени агрегации в течение 28 дней при 40°C не наблюдали.

Пример 9. Выделение затравок тау-белка у мышей rTg4510

Мыши rTg4510 являются трансгенными по двум генам, при этом совместно экспрессируют тау-белок 4R0N с мутацией P301L в человеческом гене MAPT, расположенном ниже тетрациклинового оператора-репондера (TRE), и конструкцию активатора, состоящую из тетрациклиновой системы условной экспрессии гена (tTA). Мутация P301L представляет собой доминантную мутацию, приводящую к лобно-височной деменции с паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (FTDP-17). У мышей rTg4510 экспрессия P301L hTau индуцирует патологию тау-белка, в том числе образование ранних клубков и нейрофибриллярных клубков (NFT), потерю нейронов и поведенческие аномалии, зависимым от возраста образом. NFT представляют собой агрегаты тау-белка внутри нейронов, состоящие из парных спиральных филаментов (PHF), закрученных лент или прямых филаментов, при этом они являются нерастворимыми в детергентах и содержат в основном гиперфосфорилированный тау-белок. Гиперфосфорилирование означает, что тау-белок является фосфорилированным в большем количестве участков, чем тау-белок из головного мозга здорового взрослого человека, и что по заданному участку фосфорилируется более высокий, чем в норме, процент молекул тау-белка (>8 моль фосфо/моль тау-белка). Анатомическое распределение NFT представляет собой посмертный гистопатологический характерный признак, который коррелирует со снижением когнитивных способностей при болезни Альцгеймера (AD) и с потерей памяти при нормальном старении и умеренном когнитивном расстройстве. Паттерн распределения NFT в головном мозге пациентов с AD является высокоиерархическим и был разделен на шесть стадий. Постепенное возникновение изменений NFT в головном мозге также подтверждали биохимическим путем и классифицировали на десять стадий в соответствии с пораженной областью. Определение характеристик различных молекул тау-белка из образцов головного мозга от субъектов с AD биохимическим путем изначально основывалось на протоколе фракционирования с применением 1% саркозила для выделения нерастворимого тау-белка. На основании этого способа нерастворимые в саркозиле гиперфосфорилированные молекулы тау-белка, выделенные во фракцию нерастворимого в саркозиле осадка (P3), определяли в качестве PHF тау-белка и рассматривали в качестве биохимического эквивалента NFT. Растворимые в буфере гиперфосфорилированные молекулы тау-белка, выделенные в растворимую фракцию (S1), определяли в качестве нефибриллярных олигомерных молекул тау-белка и рассматривали в качестве биохимического эквивалента ранних клубков тау-белка. У мышей rTg4510 нормальный мономерный фосфорилированный и нефосфорилированный человеческий трансгенный тау-белок 4R0N присутствует в растворимой фракции (S1) и визуализируется в виде молекул тау-белка размером 55 кДа на SDS-PAGE. Гиперфосфорилированный тау-белок 4R0N с мутацией P301L отображался в виде тау-белка со смещенной подвижностью размером 64 кДа и 70 кДа в растворимой (S1) фракции и исключительно во фракции растворимого в Tris-солевом буферном растворе (TBS) осадка (S1p) и фракции нерастворимого в саркозиле осадка (P3). Нерастворимые в саркозиле молекулы тау-белка размером 64 кДа и 70 кДа, выделенные в P3, представляют собой фибриллы тау-белка (PHF тау-белка) и биохимический эквивалент NFT. Растворимые в буфере молекулы тау-белка размером 64 кДа и 70 кДа в S1 и обогащенные во фракции растворимого в TBS осадка (S1p) представляют собой олигомерный тау-белок и биохимический эквивалент ранних клубков тау-белка. Молекулы тау-белка размером 70 кДа являются специфичными для мутанта P301L и также обнаруживаются в образцах головного мозга от пациентов с FTDP-17. Ткань головного мозга от 40-недельных мышей rTg4510 гомогенизировали в 10 объемах TBS, содержащего 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 274 mM NaCl и 5 mM KCl. Гомогенаты центрифугировали при 27000×g в течение 20 мин. при 4°C с получением фракций надосадочной жидкости (S1) и осадка (P1). Экстрагируемую в TBS фракцию S1 разделяли путем центрифугирования при 150000 x g в течение 1 ч при 4°C на фракции надосадочной жидкости (S1s) и осадка (S1p). Осадок S1p повторно суспендировали в 10 mM Tris/HCl [pH 8,0] до объема, равного одной пятой исходного объема S1. Осадок P1 повторно гомогенизировали в 5 объемах буфера с высокой концентрацией солей/сахарозы (0,8 M NaCl, 10% сахарозы, 10 mM Tris/HCl, [pH 7,4]) и центрифугировали при 27000 x g в течение 20 мин. при 4°C. Образцы надосадочной жидкости собирали и инкубировали с саркозилем (конечная концентрация 1%; Sigma) в течение 1 ч при 37°C с по-

следующим центрифугированием при 150000×g в течение 1 ч при 4°C с получением образцов нерастворимого в саркозиле осадка, называемых в данном документе фракцией P3. Осадок P3 ресуспендировали в 10 mM Tris/HCl [pH 8,0] до объема, равного половине исходного объема, используемого для гомогенатов головного мозга. Патологический тау-белок из головного мозга мыши rTg4510, характеризующийся на SDS-PAGE как гиперфосфорилированный тау-белок размером 64 и 70 кДа, присутствовал исключительно во фракциях S1p и P3 в виде растворимого в TBS олигомерного тау-белка и нерастворимого в саркозиле фибриллярного тау-белка соответственно. Фракции S1s содержали нормальный нефосфорилированный и фосфорилированный тау-белок, отображаемый на SDS-PAGE в виде тау-белка размером 55 кДа. Патологический тау-белок, растворимый олигомерный и нерастворимый фибриллярный, выделенный во фракциях S1p и P3 соответственно, использовали в качестве затравок гиперфосфорилированного тау-белка для рекрутинга эндогенного мономерного человеческого тау-белка с образованием включений агрегированного тау-белка и для индуцирования затравочного действия в отношении тау-белка в культурах первичных кортикальных нейронов, выделенных у мышей rTg4510.

Анализ затравочного действия в культуре первичных нейронов, выделенных у мышей rTg4510

Мышинные кортикальные нейроны (CTX) выделяли из E14-16-дневных эмбрионов мышей rTg4510. Трансгенных по одному гену, активатору tTA, мышей спаривали в определенное время с трансгенными по одному гену, респондере мутантного тау-белка, мышами. Беременных самок умерщвляли через 14-16 дней после зачатия и эмбрионы генотипировали с помощью ДНК головного мозга с применением пар праймеров 5'-GATTAACAGCGCATTAGAGCTG-3' и 5'-GCATATGATCAATTCAAGGCCGATAAG-3' для трансгена активатора tTA и 5'-TGAACACAGGATGGCTGAGCC-3' и 5'-TTGTCATCGCTCCAGTCCCCG-3' для трансгена респондера мутантного тау-белка, при этом выделенные образцы эбриональной коры головного мозга хранили в среде Hibernate E без хлорида кальция (BrainBits LLC) при 4°C. Образцы коры головного мозга из эмбрионов мышей rTg4510 отбирали и диссоциированные нейроны высевали на покрытые 100 мкг/мл поли-L-лизин чашки при плотности 0,13×10⁶ клеток/см² (420000 клеток/мл, 100 мкл/лунка, 96-луночный планшет) и культивировали в кондиционированной глией нейробазальной среде, дополненной 2% раствором добавки B-27 с антиоксидантами, 0,5 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина (все растворы от Gibco-BRL Invitrogen). Кондиционированную глией нейробазальную среду получали с помощью конфлюэнтных и непролиферирующих культур первичных мышинных астроцитов после 24 ч инкубации. Подпитку нейронов осуществляли через 4 дня *in vitro* (DIV) путем замены половины среды свежей кондиционированной глией нейробазальной средой и последующую подпитку осуществляли на каждый седьмой день. На DIV4 после подпитки культуру нейронов обрабатывали с помощью 1 мкМ цитозин-арабинозида для остановки пролиферации клеток. Доля глиальных клеток в культурах составляла менее 10%, как определяли с помощью антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) на DIV15. CTX от мышей rTg4510 экспрессировали эндогенный мышинный тау-белок и трансгенный человеческий тау-белок 4R0N. CTX от мышей rTg4510 содержали только нормальный человеческий мономерный нефосфорилированный и фосфорилированный тау-белок, отображаемый на SDS-PAGE в виде полос тау-белка размером 55 кДа; при этом в нативных CTX от мышей rTg4510 молекулы гиперфосфорилированного тау-белка отсутствовали (64 и 70 кДа). На DIV7 затравочное действие в отношении тау-белка индуцировали путем инкубирования CTX с затравками патологического тау-белка в виде либо растворимого олигомерного, либо нерастворимого фибриллярного гиперфосфорилированного тау-белка, выделенного во фракциях S1p и P3 соответственно. Полное изменение среды проводили на DIV11 для предотвращения непрерывного поглощения затравок патологического тау-белка, и затравочное действие в отношении тау-белка в CTX измеряли на DIV15. Затравочное действие в отношении тау-белка характеризовалось рекрутингом мономерного растворимого человеческого тау-белка с образованием включений агрегированного и гиперфосфорилированного тау-белка, отображающихся на SDS-PAGE в виде полос тау-белка со смещенной подвижностью при более высоком молекулярном весе, составляющем 64, 70 и 140 кДа. Обе затравки гиперфосфорилированного тау-белка, растворимого олигомерного или нерастворимого фибриллярного из фракций S1p и P3 соответственно, в равной степени индуцировали затравочное действие в отношении тау-белка в CTX. Для изучения эффекта антител к тау-белку на затравочное действие в отношении тау-белка CTX обрабатывали смесью из 0,1 мкл фракции P3 или 0,2 мкл фракции S1p (содержащими 0,2 нг общего человеческого тау-белка), выделенными у 40-недельных мышей rTg4510, и 10 мкг антитела (hC10.2, hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S, контрольный IgG человека) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Смесью затравки тау-белка и антитела предварительно инкубировали в течение 2 ч при 4°C перед добавлением к CTX. На DIV11 выполняли полную замену среды на свежую кондиционированную глией нейробазальную среду. На DIV15 нейроны лизировали в ледяном буфере с Triton для лизиса (1% Triton X-100 в 50 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7,6) с 1% смесью ингибиторов протеаз (Roche), 1% смесью ингибиторов протеаз I и II (Sigma) и 0,2% бензоназы (Sigma)) при встряхивании при 200 об./мин в течение 45 мин при 4°C и лизаты использовали в анализе агрегации *in vitro* Cisbio, и содержание белка определяли с использованием анализа с бидинхониновой кислотой (BCA) согласно инструкциям производителя. В основе анализа агрегации тау-белков от Cisbio

лежит флуоресценция с временным разрешением с применением одного и того же антитела в качестве как донорного (конъюгированного с Tb3+), так и акцепторного (конъюгированного с d2) антитела в резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET), и его выполняли согласно инструкциям производителя. Вкратце, образец объемом 9 мкл смешивали со смесью антител объемом 9 мкл и инкубировали в течение 20 ч. Планшет прочитывали на планшет-ридере PHERAstar для оценки флуоресценции с временным разрешением (измеренного/интегрированного после включения возбуждающего света сигнала FRET). В данном анализе измеряли агрегацию тау-белка, как олигомеров, так и фибрилл тау-белка, в материале головного мозга от мышей rTg4510 и в лизатах нейронов от подвергнутых затравочному действию в отношении тау-белка CTX, выделенных из эмбрионов rTg4510, с высокой специфичностью и чувствительностью. Результаты можно увидеть на фиг. 21. Инкубирование затравок из P3 или S1p с человеческим контрольным антителом IgG приводило к аналогичному сигналу агрегации тау-белка из подвергнутых затравочному действию CTX как инкубирование затравок из P3 или S1p с PBS. Сигналы от PBS и человеческого контрольного антитела IgG усредняли и принимали за 100% агрегации тау-белка. Антитела к тау-белку hC10.2, hC10.2N32S и hC10.2A101T-N32S значительно уменьшали сигналы агрегации тау-белка, обусловленные индуцированным как P3, так и S1p затравочным действием в отношении тау-белка, на DIV15. Результаты 2 отдельных экспериментов обобщали. Антитело hC10.2 уменьшало индуцированное P3 и S1p затравочное действие в отношении тау-белка на 23%. Варианты hC10.2N32S и hC10.2A101T-N32S уменьшали индуцированное P3 и S1p затравочное действие в отношении тау-белка на 41-53% и 48-60% соответственно. Варианты hC10.2N32S и hC10.2A101T-N32S превосходили hC10.2 в отношении снижения затравочного действия в отношении тау-белка в CTX от rTg4510, индуцированного затравками гиперфосфорилированного тау-белка из S1p или P3, состоящих из олигомерного или фибриллярного тау-белка соответственно.

Пример 10. Дозозависимое окрашивание структур тау-белка у мышей rTg4510 после i.v. инъекции hC10-2_N32S_A101T

Способ:

Двенадцатимесячные мыши rTg4510.

Эти трансгенные мыши экспрессируют человеческий мутантный тау-белок (P301L 0N4R) под контролем элемента ответа Tet-Off в Camk2-положительных нейронах и характеризуются выраженным гиперфосфорилированием тау-белка и образованием клубков, начиная с возраста 6 месяцев и далее. Кроме того, у мышей rTg4510 возрастом 12 месяцев присутствует нейродегенерация в областях с выраженной патологией. Мыши получали однократную i.v. инъекцию в хвостовую вену антител hC10-2_N32S в дозах 80, 20, 8 мг/кг и 0,8 мг/кг. Каждой мыши проводили инъекцию в объеме 100 микролитров. Через три дня после инъекции мышей перфузировали в течение 2 мин с помощью PBS с последующей перфузией в течение 10 мин с помощью 4% параформальдегида. Образцы головного мозга подвергали криозащите в 30% сахарозе и нарезали на свободно плавающие криосрезы толщиной 40 микрон. Срезы инкубировали с 5% нормальной свиной сывороткой крови в PBS/1% BSA/0,3% Triton X-100 в течение 20 мин, промывали в PBS и наконец инкубировали с конъюгированным с AlexaFluor488 вторичным антителом к IgG человека при 1:200 (№709-545-149; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест Гров, США). Срезы промывали в PBS, монтировали на предметное стекло и исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты

I.v. инъекция hC10-2_N32S приводила к связыванию in vivo с целевыми структурами главным образом в гиппокампе и коре головного мозга из образцов головного мозга животных rTg4510 соответствующего возраста (фиг. 1). Число наблюдаемых положительных структур варьировало между отдельными животными rTg4510. Положительные сигналы в образцах головного мозга rTg4510 было нелегко выявить как внутриклеточный окрашенный материал, и они могли представлять собой внеклеточный материал тау-белка, высвобождаемым во время процесса нейродегенерации. С помощью полуколичественной оценки наиболее высокие сигналы (интенсивность флуоресценции и число положительных структур) выявляли у всех мышей, которым вводили дозу 20 и 80 мг/кг (табл. 6). Меченые структуры наблюдались при 8 мг/кг у 3 из 4 мышей, однако на явно более низком уровне, чем при 20 и 80 мг/кг. Внутривенная инъекция в дозе 0,8 мг/кг не приводила к появлению сигналов, превышающих фоновый уровень, при применяемом способе визуализации. В совокупности эти данные позволяют предположить, что антитела hC10-2_N32S способны дозозависимым образом проникать в паренхиму головного мозга и специфично окрашивать мишени у мышей rTg4510 in vivo (фиг. 22).

Таблица 6

Tg4510 соответствующего возраста n=	i.v. инъекция hC10-2_N32S	Сигнал флуоресценции	Интенсивность (по отношению к 80 мг/кг)
3	80 мг/кг	+ у 3/3	+++
4	20 мг/кг	+ у 4/4	++-+++
4	8 мг/кг	+ у 3/4	+
4	0,8 мг/кг	- у 4/4	0

Флуоресцентно-меченые структуры тау-белка, выявленные в срезах головного мозга после i.v. инъекции hC10-2_N32S. Полуколичественная оценка: +++ сильный; ++ умеренный; + слабый; 0 не выявлен.

Пример 11. Затравочное действие в отношении тау-белка с формированием патологии тау-белка

Получение затравки

Замороженные образцы кортикальной ткани от доноров с AD получали от Tissue Solutions (Глазго, Великобритания). Ткань головного мозга взвешивали и гомогенизировали с применением ножового гомогенизатора в стерильном холодном PBS (10 кратный объем образца головного мозга). Гомогенат затем подвергали ультразвуковой обработке на ультразвуковом дезинтеграторе Branson с установленным режимом выходной мощности 2 с импульсами 5×0,9 с. Гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 4°C и надосадочную жидкость разделяли на аликвоты, подвергали мгновенной заморозке и хранили при -80°C до применения.

Животные, используемые в исследовании

Использовали трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий мутантный тау-белок (P301L 0N4R) под контролем транскрипционного элемента, контролируемого тетрациклином, в CamKII-положительных нейронах (rtg4510). В этой модели патология обычно начинает развиваться в возрасте 3-4 месяцев. При скормливания матерям доксициклина во время беременности и в течение первых 3 недель жизни детеныша патология развивается на более поздней стадии (с возраста 6 месяцев). Возраст используемых в данных исследованиях мышей, предварительно обработанных доксициклином, во время подвергания затравочному действию составлял 2,5 месяца.

Обработка антителами

Антитела получали в концентрации 1,5 мг/мл в стерильном PBS и разделяли на аликвоты с достаточным количеством антитела для одного момента времени введения дозы. Аликвоты хранили при 4°C до применения. Начиная с возраста 2 месяцев до умерщвления в возрасте 5,5 месяцев мыши получали недельную IP дозу антитела (15 мг/кг, равную 10 мл/кг). Используемые антитела: контрольное человеческое B12-IgG1, hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T.

Стереотаксическая инъекция

Непосредственно после получения 3-й дозы антитела мыши получали анестезию, будучи зафиксированными в стереотаксической рамке, путем вдыхания изофлурана. Череп обнажали, и его положение выравнивали, пока брегма и лямбда не расположились на одном уровне. В черепе просверливали отверстие на 2 мм латеральнее (справа) и на 2,4 мм кзади от брегмы. Шприц со скошенным наконечником 26 калибра на 10 мкл (SGE) применяли для инъекции затравочного материала на 1,4 мм вентральнее поверхности головного мозга.

Два мкл материала вводили путем медленной инфузии в необходимое место (0,5 мкл/мин.) и после этого шприц оставляли еще на 5 мин перед извлечением. Рану закрывали и наживали швы, и мышей согревали во время выхода из анестезии. Затем мышей содержали в течение 3 месяцев до выполнения перфузионной фиксации с помощью 4% параформальдегида.

Гистология

Фиксированные образцы головного мозга обрабатывали в Neuroscience Associates (Ноксвилл, Теннесси) с применением технологии MultiBrain®. Не более 25 образцов головного мозга мышей совместно заливали в один блок и нарезали в замороженном виде на срезы по 35 мкм во фронтальной плоскости через весь головной мозг. Каждый 6-й срез окрашивали с помощью окрашивания серебром по Gallyas для обнаружения нейрофибрилярных клубков. Срезы монтировали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и подсчет нейронов (сому), положительных по окрашиванию серебром по Gallyas, проводили во всех образцах головного мозга в гиппокампе со стороны инъекции. Включали все подобласти гиппокампа. Подсчет проводили в восьми срезах на головной мозг. Результаты отражают суммарное количество положительных нейронов из 8 срезов.

Результат

Все из hC10-2, hC10-2_N32S и hC10-2_N32S_A101T значительно уменьшали затравочное действие клубков тау-белка в подвергнутом инъекции гиппокампе (однофакторный апова и критерий для множественных сравнений Тьюки). hC10-2: 50%, hC10-2_N32S: 47% и hC10-2_N32S_A101T: 60% по сравнению с мышами, обработанными контролем (фиг. 23).

Перечень последовательностей

<110> Х. ЛУНДБЕКК А/С
 <120> АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАННОМУ ТАУ-БЕЛКУ
 <130> 1049-WO-РСТ
 <160> 57
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 441
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Человеческий тау-белок
 <400> 1
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

039569

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 2
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
 <223> остатки 386-408 тау-белка (pS396, pS404)

<400> 2

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20

<210> 3
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи C10-2

<400> 3

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 4
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR2 легкой цепи C10-2

<400> 4

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR3 легкой цепи C10-2

<400> 5

Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи C10-2

<400> 6

Asp Arg Thr Ile His
 1 5

<210> 7
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи C10-2

<400> 7

Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR3 тяжелой цепи C10-2

<400> 8

Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 9
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Легкая цепь мышиноного C10-2

<400> 9

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 10
 <211> 439
 <212> БЕЛОК
 <213> Тяжелая цепь мышинного C10-2
 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105
 Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190
 Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
 210 215 220
 Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 260 265 270
 Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 325 330 335
 Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
 340 345 350
 Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 355 360 365
 Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 405 410 415
 Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 11
<211> 445
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Тяжелая цепь гуманизированного C10-2

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

039569

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> легкая цепь гуманизированного C10-2

<400> 12

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

039569

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 444
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Вариант D55E тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg

20										25					30				
Thr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
		35					40					45							
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe				
	50					55					60								
Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Arg	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr				
			100					105						110					
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro				
		115					120					125							
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val				
	130					135					140								
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala				
145					150					155					160				
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly				
				165					170						175				
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly				
			180					185						190					
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys				
		195					200					205							
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys				
	210					215					220								
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
225					230					235					240				
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu				
				245					250					255					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys				
			260					265					270						
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
		275					280					285							
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu				
	290					295					300								

039569

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 14
<211> 444
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Вариант D55Q тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

039569

				85				90				95			
Ala	Arg	Arg	Gly 100	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp 105	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser 110	Val	Thr
Val	Ser	Ser 115	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly 120	Pro	Ser	Val	Phe	Pro 125	Leu	Ala	Pro
Ser	Ser 130	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly 135	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu 140	Gly	Cys	Leu	Val
Lys 145	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu 150	Pro	Val	Thr	Val	Ser 155	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala 160
Leu	Thr	Ser	Gly	Val 165	His	Thr	Phe	Pro	Ala 170	Val	Leu	Gln	Ser	Ser 175	Gly
Leu	Tyr	Ser	Leu 180	Ser	Ser	Val	Val	Thr 185	Val	Pro	Ser	Ser	Ser 190	Leu	Gly
Thr	Gln	Thr 195	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val 200	Asn	His	Lys	Pro	Ser 205	Asn	Thr	Lys
Val	Asp 210	Lys	Arg	Val	Glu	Pro 215	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys 220	Thr	His	Thr	Cys
Pro 225	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro 230	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly 235	Pro	Ser	Val	Phe	Leu 240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 245	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 250	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro 255	Glu
Val	Thr	Cys	Val 260	Val	Val	Asp	Val	Ser 265	His	Glu	Asp	Pro	Glu 270	Val	Lys
Phe	Asn	Trp 275	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 280	Glu	Val	His	Asn	Ala 285	Lys	Thr	Lys
Pro	Arg 290	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 295	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 300	Val	Ser	Val	Leu
Thr 305	Val	Leu	His	Gln	Asp 310	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 315	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 320
Val	Ser	Asn	Lys	Ala 325	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 330	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 335	Lys
Ala	Lys	Gly	Gln 340	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 345	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 350	Pro	Ser
Arg	Glu	Glu 355	Met	Thr	Lys	Asn	Gln 360	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 365	Leu	Val	Lys

039569

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 15
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант D55S тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val₁₆₅ His Thr Phe Pro Ala₁₇₀ Val Leu Gln Ser Ser Gly₁₇₅
 Leu Tyr Ser Leu₁₈₀ Ser Ser Val Val Thr₁₈₅ Val Pro Ser Ser Ser₁₉₀ Leu Gly
 Thr Gln Thr₁₉₅ Tyr Ile Cys Asn Val₂₀₀ Asn His Lys Pro Ser₂₀₅ Asn Thr Lys
 Val Asp₂₁₀ Lys Arg Val Glu Pro₂₁₅ Lys Ser Cys Asp Lys₂₂₀ Thr His Thr Cys
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro₂₃₀ Glu Leu Leu Gly Gly₂₃₅ Pro Ser Val Phe Leu₂₄₀
 Phe Pro Pro Lys Pro₂₄₅ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₀ Ile Ser Arg Thr Pro Glu₂₅₅
 Val Thr Cys Val₂₆₀ Val Val Asp Val Ser₂₆₅ His Glu Asp Pro Glu₂₇₀ Val Lys
 Phe Asn Trp₂₇₅ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₀ Glu Val His Asn Ala₂₈₅ Lys Thr Lys
 Pro Arg₂₉₀ Glu Glu Gln Tyr Asn₂₉₅ Ser Thr Tyr Arg Val₃₀₀ Val Ser Val Leu
 Thr Val₃₀₅ Leu His Gln Asp₃₁₀ Trp Leu Asn Gly Lys₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₀
 Val Ser Asn Lys Ala₃₂₅ Leu Pro Ala Pro Ile₃₃₀ Glu Lys Thr Ile Ser Lys₃₃₅
 Ala Lys Gly Gln₃₄₀ Pro Arg Glu Pro Gln₃₄₅ Val Tyr Thr Leu Pro₃₅₀ Pro Ser
 Arg Glu Glu₃₅₅ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₀ Val Ser Leu Thr Cys₃₆₅ Leu Val Lys
 Gly Phe₃₇₀ Tyr Pro Ser Asp Ile₃₇₅ Ala Val Glu Trp Glu₃₈₀ Ser Asn Gly Gln
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₀ Thr Thr Pro Pro Val₃₉₅ Leu Asp Ser Asp Gly₄₀₀
 Ser Phe Phe Leu Tyr₄₀₅ Ser Lys Leu Thr Val₄₁₀ Asp Lys Ser Arg Trp Gln₄₁₅
 Gln Gly Asn Val₄₂₀ Phe Ser Cys Ser Val₄₂₅ Met His Glu Ala Leu₄₃₀ His Asn

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 16
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32S легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 16

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 17
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32Q легкой цепи гуманизированного C10-2

<400> 17

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 18
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N34S легкой цепи гуманизированного C10-2

<400> 18

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 19
 <211> 214
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Вариант N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2

<400> 19

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Вариант N32S, N34S легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 20
 Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 21
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Вариант N32Q, N34S легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 21

039569

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 22
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Вариант N32Q, N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2
<400> 22

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

039569

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> Вариант N32S, N34Q легкой цепи гуманизированного C10-2
<400> 23

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser

039569

20 25 30
 Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 24
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Вариант A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

039569

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 25
<211> 444
<212> БЕЛЮК
<213> Искусственная

<220>
<223> Вариант D55E, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440
 <210> 26
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Вариант D55Q, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val₁₆₅ His Thr Phe Pro Ala₁₇₀ Val Leu Gln Ser Ser Gly₁₇₅
 Leu Tyr Ser Leu₁₈₀ Ser Ser Val Val₁₈₅ Thr Val Pro Ser Ser Ser₁₉₀ Leu Gly
 Thr Gln Thr₁₉₅ Tyr Ile Cys Asn Val₂₀₀ Asn His Lys Pro Ser₂₀₅ Asn Thr Lys
 Val Asp₂₁₀ Lys Arg Val Glu Pro₂₁₅ Lys Ser Cys Asp Lys₂₂₀ Thr His Thr Cys
 Pro₂₂₅ Pro Cys Pro Ala Pro₂₃₀ Glu Leu Leu Gly Gly₂₃₅ Pro Ser Val Phe Leu₂₄₀
 Phe Pro Pro Lys Pro₂₄₅ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₀ Ile Ser Arg Thr Pro₂₅₅ Glu
 Val Thr Cys Val₂₆₀ Val Val Asp Val Ser₂₆₅ His Glu Asp Pro Glu₂₇₀ Val Lys
 Phe Asn Trp₂₇₅ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₀ Glu Val His Asn Ala₂₈₅ Lys Thr Lys
 Pro Arg₂₉₀ Glu Glu Gln Tyr Asn₂₉₅ Ser Thr Tyr Arg Val₃₀₀ Val Ser Val Leu
 Thr Val₃₀₅ Leu His Gln Asp₃₁₀ Trp Leu Asn Gly Lys₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₀
 Val Ser Asn Lys Ala₃₂₅ Leu Pro Ala Pro Ile₃₃₀ Glu Lys Thr Ile Ser Lys₃₃₅
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln₃₄₅ Val Tyr Thr Leu Pro₃₅₀ Pro Ser
 Arg Glu Glu₃₅₅ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₀ Val Ser Leu Thr Cys₃₆₅ Leu Val Lys
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile₃₇₅ Ala Val Glu Trp Glu₃₈₀ Ser Asn Gly Gln
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₀ Thr Thr Pro Pro Val₃₉₅ Leu Asp Ser Asp Gly₄₀₀
 Ser Phe Phe Leu Tyr₄₀₅ Ser Lys Leu Thr Val₄₁₀ Asp Lys Ser Arg Trp₄₁₅ Gln
 Gln Gly Asn Val₄₂₀ Phe Ser Cys Ser Val₄₂₅ Met His Glu Ala Leu₄₃₀ His Asn
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

<210> 27
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Вариант D55S, A101T тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 27
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro 225 Pro Cys Pro Ala Pro 230 Glu Leu Leu Gly Gly 235 Pro Ser Val Phe Leu 240
 Phe Pro Pro Lys Pro 245 Lys Asp Thr Leu Met 250 Ile Ser Arg Thr Pro Glu 255
 Val Thr Cys Val 260 Val Val Asp Val Ser 265 His Glu Asp Pro Glu 270 Val Lys
 Phe Asn Trp 275 Tyr Val Asp Gly Val 280 Glu Val His Asn Ala 285 Lys Thr Lys
 Pro Arg Glu 290 Glu Gln Tyr Asn 295 Ser Thr Tyr Arg Val 300 Val Ser Val Leu
 Thr Val 305 Leu His Gln Asp 310 Trp Leu Asn Gly Lys 315 Glu Tyr Lys Cys Lys 320
 Val Ser Asn Lys Ala 325 Leu Pro Ala Pro Ile 330 Glu Lys Thr Ile Ser 335 Lys
 Ala Lys Gly Gln 340 Pro Arg Glu Pro Gln 345 Val Tyr Thr Leu Pro 350 Pro Ser
 Arg Glu Glu 355 Met Thr Lys Asn Gln 360 Val Ser Leu Thr Cys 365 Leu Val Lys
 Gly Phe Tyr 370 Pro Ser Asp Ile 375 Ala Val Glu Trp Glu 380 Ser Asn Gly Gln
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 390 Thr Thr Pro Pro Val 395 Leu Asp Ser Asp Gly 400
 Ser Phe Phe Leu 405 Tyr Ser Lys Leu Thr Val 410 Asp Lys Ser Arg Trp Gln 415
 Gln Gly Asn Val 420 Phe Ser Cys Ser Val 425 Met His Glu Ala Leu 430 His Asn
 His Tyr Thr 435 Gln Lys Ser Leu Ser 440 Leu Ser Pro Gly

<210> 28

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Вариант D55E CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 28

Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант D55Q CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 29

Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант D55S CDR2 тяжелой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 30

Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 31

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Asn
 1 5 10

<210> 32
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 32

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Asn
 1 5 10

<210> 33
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 33

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Ser
 1 5 10

<210> 34
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 34

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Gln
 1 5 10

<210> 35
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32S, N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 35

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Ser
 1 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32Q, N34S CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 36

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Ser
 1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32Q, N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 37

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Gln
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант N32S, N34Q CDR1 легкой цепи гуманизированного C10-2
 <400> 38

Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Gln

1 5 10

<210> 39
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вариант A101T CDR3 тяжелой цепи гуманизированного C10-2

<400> 39
 Arg Gly Thr Met Asp Tyr
 1 5

<210> 40
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> IMGT C10.2 LC CDR1

<400> 40
 Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 1 5

<210> 41
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> IMGT C10.2 LC CDR2

<400> 41
 Gly Ala Ser
 1

<210> 42
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> IMGT C10.2 LC CDR3

<400> 42
 Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
 1 5

<210> 43
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> IMGT C10.2 HC CDR1

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT C10.2 HC CDR2

<400> 44

Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT C10.2 HC CDR3

<400> 45

Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT N32S/ N32S,A101T LC CDR1

<400> 46

Gln Asp Thr Ser Ile Ser
1 5

<210> 47
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT N32S/N32S,A101T LC CDR2

<400> 47

Gly Ala Ser
1

<210> 48
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT N32S/N32S,A101T LC CDR3

<400> 48

Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR1

<400> 49

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR2

<400> 50

Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR3

<400> 51

Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 HC C10.2/N32S согласно Chotia

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 HC C10.2/N32S согласно Chotia

<400> 53

Tyr Pro Gly Asp Gly Ser
1 5

<210> 54

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR3 HC C10.2/N32S согласно Chotia

<400> 54

Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 55

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR1 HC A101T/N32S,A101T согласно Chotia

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
1 5

<210> 56

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 HC A101T/N32S,A101T согласно Chotia

<400> 56

Tyr Pro Gly Asp Gly Ser
1 5

<210> 57

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR3 HC A101T/N32S,A101T согласно Chotia

<400> 57

Arg Gly Thr Met Asp Tyr
1 5

1049-WO-PCT

237

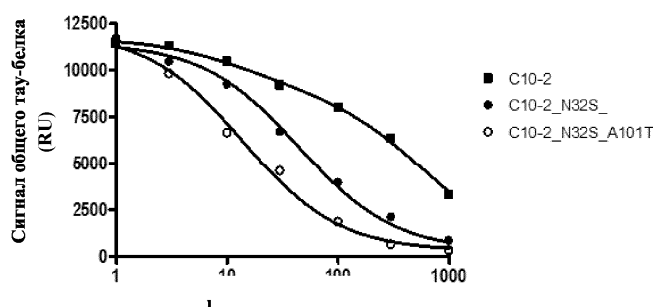
1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

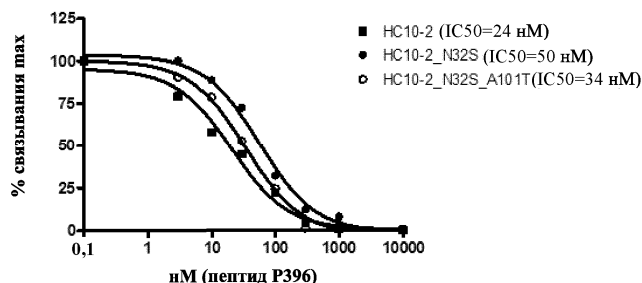
1. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело, специфически связывающееся с фосфорилированным сериновым остатком 396 человеческого тау-белка (изоформы 2N4R), или его эпитопсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, причем моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31;
- (b) CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;
- (c) CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5;
- (d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6;
- (e) CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и

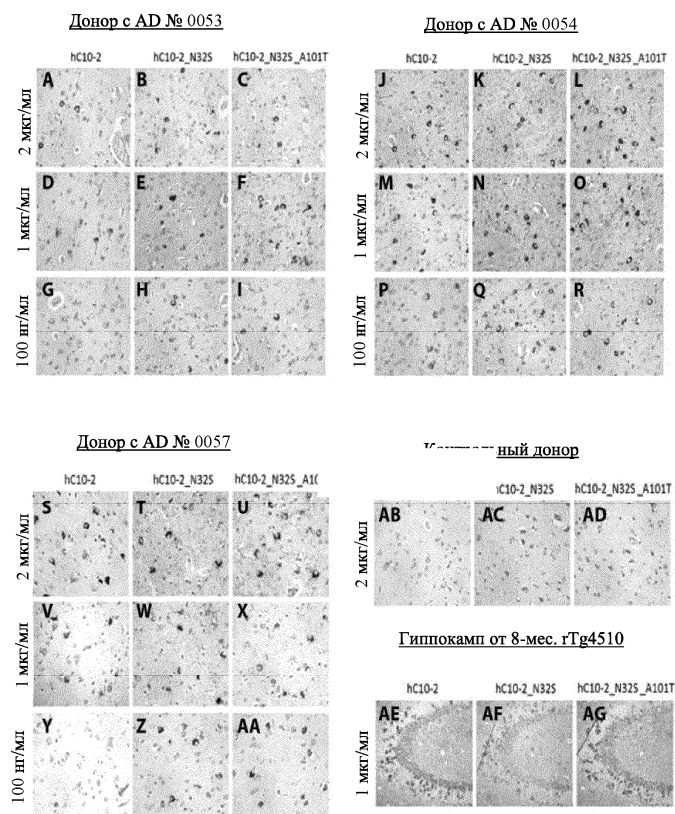
- (f) CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39.
2. Фармацевтическая композиция по п.1, причем моноклональное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит:
- легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16;
 - тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.
3. Фармацевтическая композиция по п.2, причем эпитопсвязывающий фрагмент указанного моноклонального антитела представляет собой Fab' или Fab-фрагмент.
4. Фармацевтическая композиция по пп.1-3, содержащая антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, как определено в пп.1-3, которые были получены в линии клеток или с помощью рекомбинантной технологии.
5. Фармацевтическая композиция по п.4, где линия клеток представляет собой линию человеческих клеток, линию клеток млекопитающего, отличного от человека, линию клеток насекомого, дрожжей или бактерий.
6. Фармацевтическая композиция по п.4, содержащая антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, как определено в пп.1-3, полученные в линии клеток CHO, линии клеток НЕК, линии клеток ВНК-21, линии мышинных клеток (такой как линия клеток миеломы), линии клеток фибросаркомы, линии клеток PER.C6, линии клеток НКВ-11, линии клеток САР и линии человеческих клеток HuH-7.



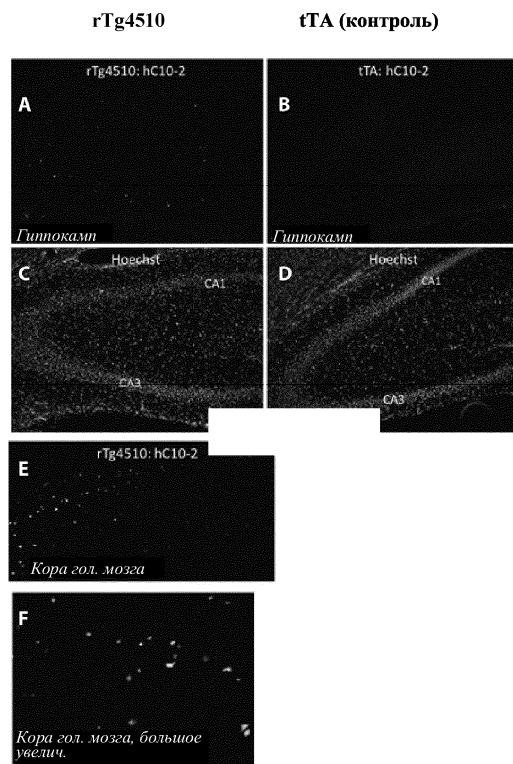
Фиг. 1



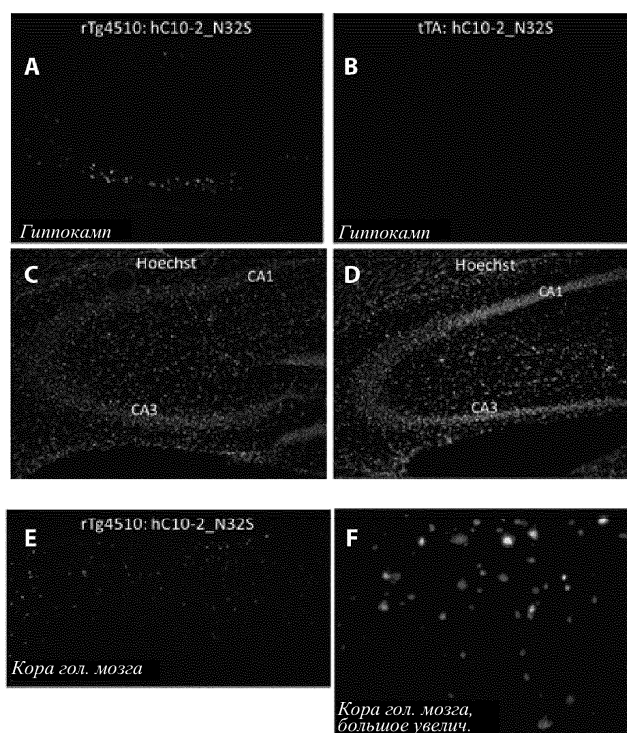
Фиг. 2



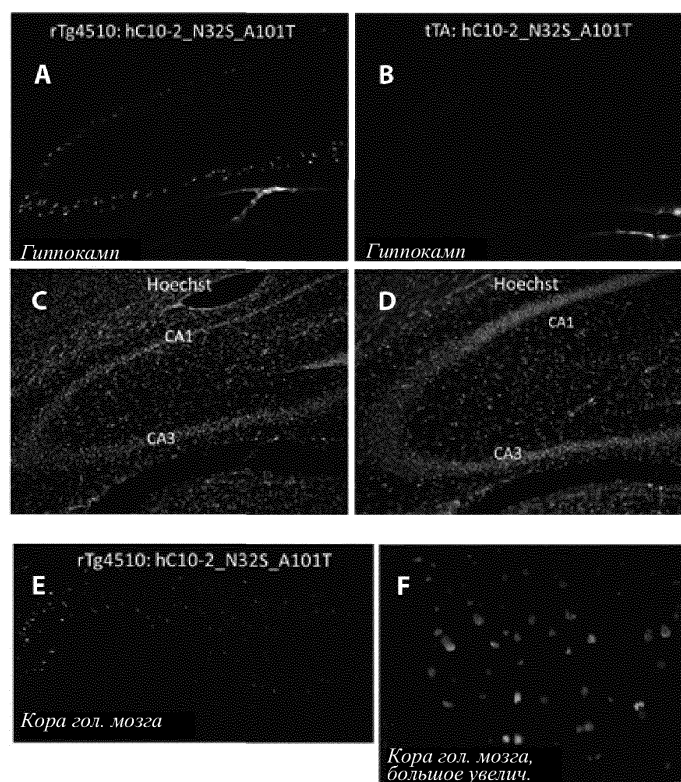
Фиг. 3



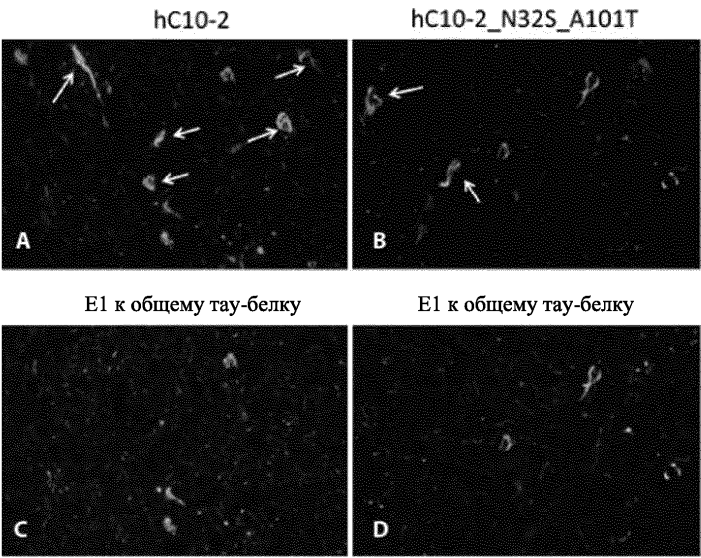
Фиг. 4



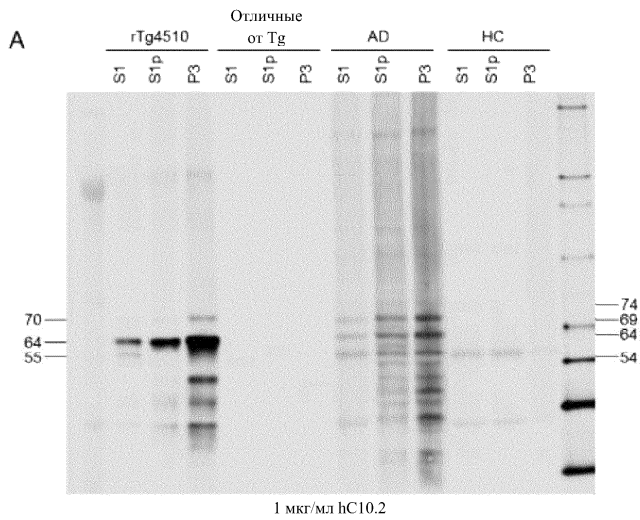
Фиг. 5



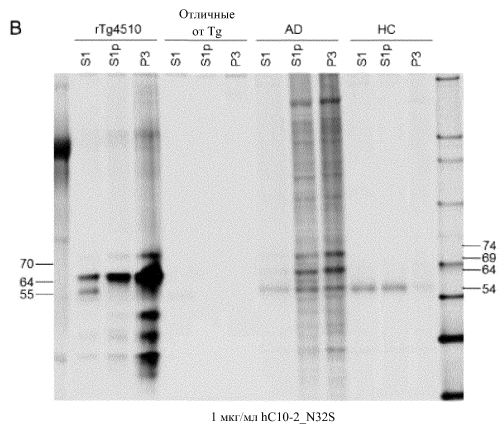
Фиг. 6



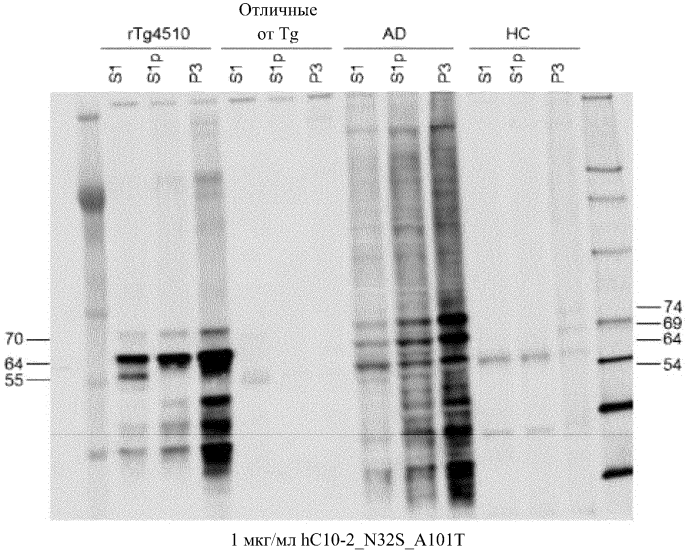
Фиг. 7



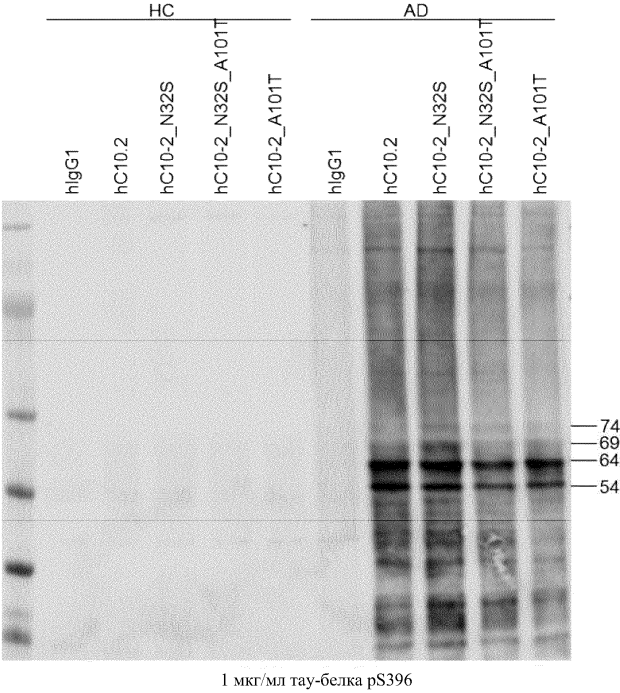
Фиг. 8А



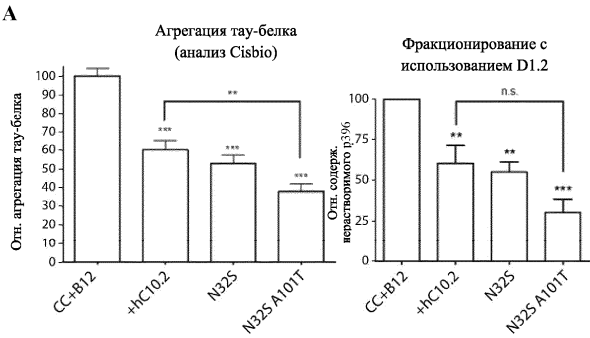
Фиг. 8В



Фиг. 8С

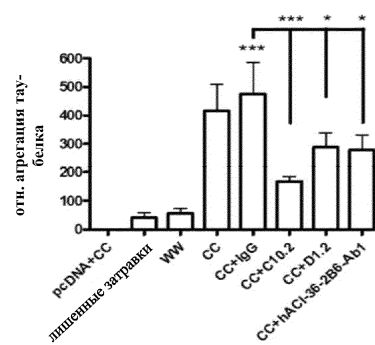


Фиг. 9

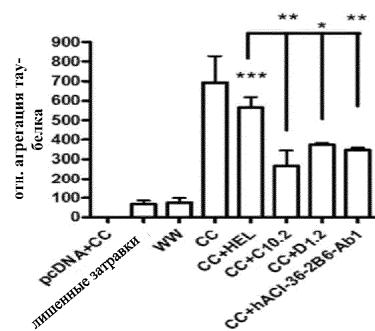


Фиг. 10А

В

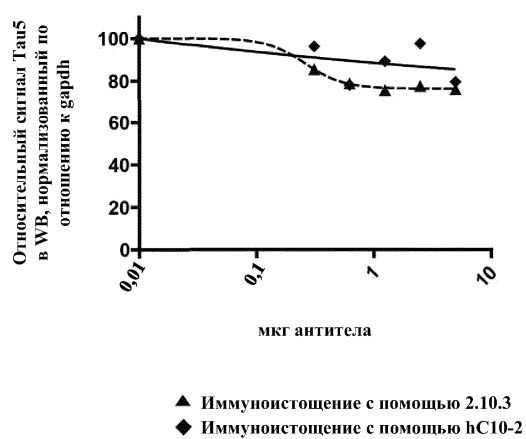


С

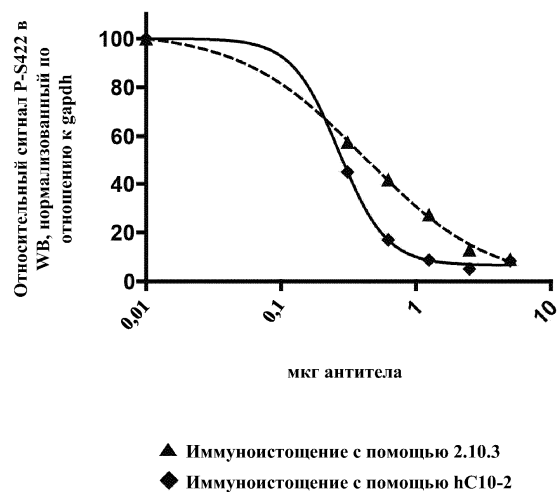


Фиг. 10В; С

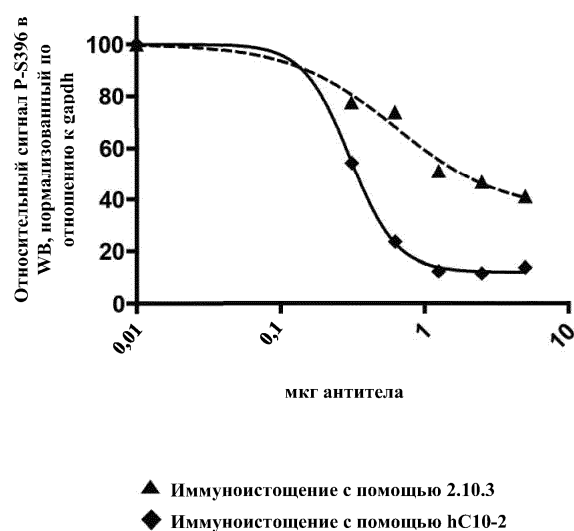
Общий тау-белок, остающийся после иммуноистощения



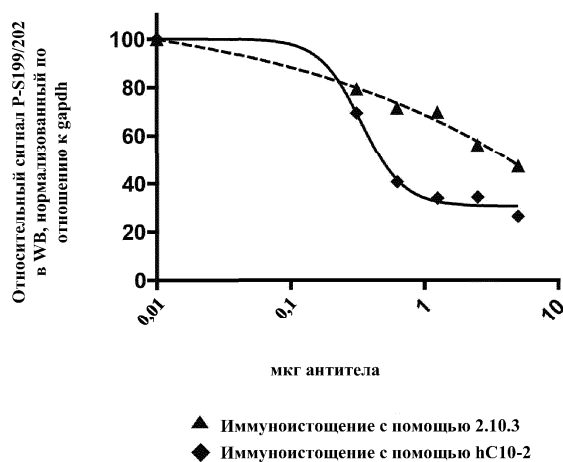
Фиг. 11



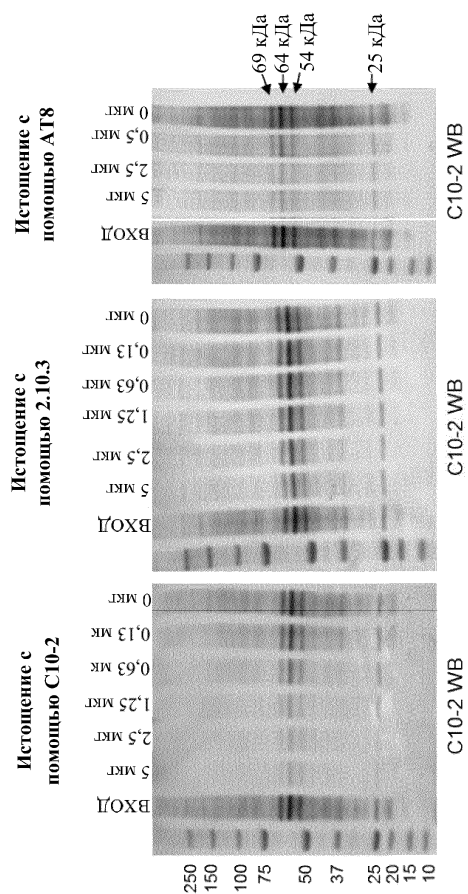
Фиг. 12



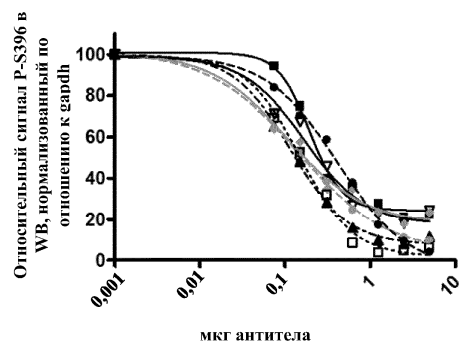
Фиг. 13



Фиг. 14

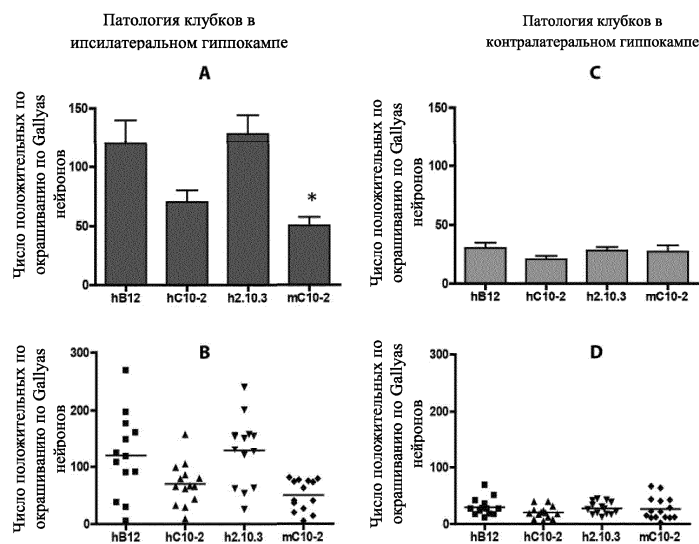


Фиг. 15

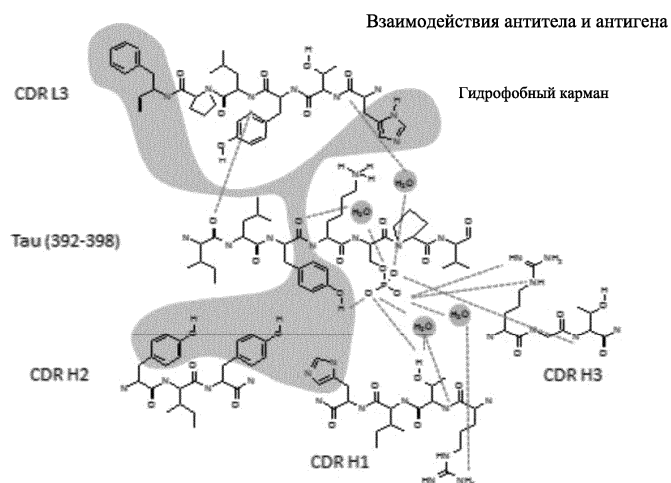


- hC10-2
- hC10-2_N32S
- ◆ hC10-2_N32S_D55E
- hC10-2_N32Q
- hC10-2_N32Q_D55E
- ▲ hC10-2_A101T_N32S
- ▼ hC10-2_A101T_N32Q

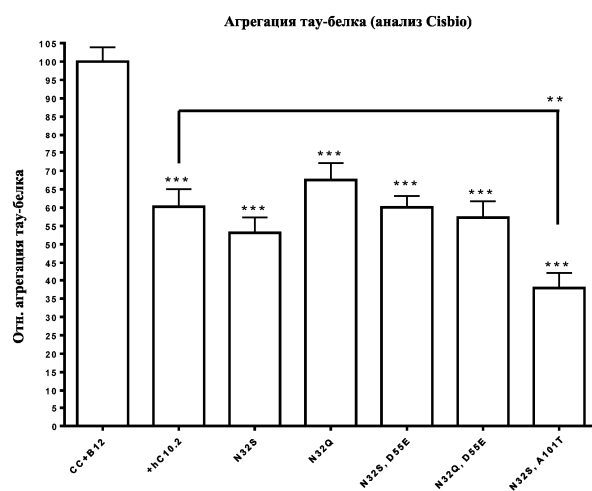
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

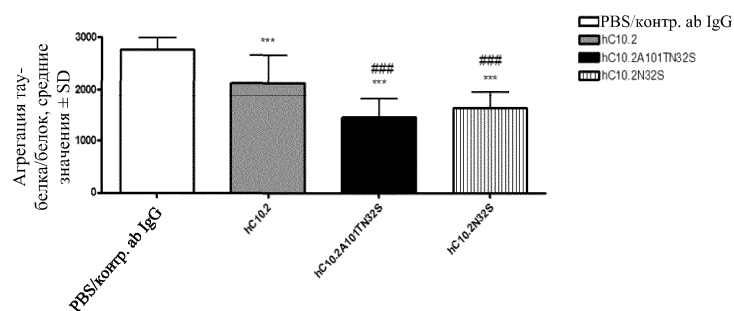


Фиг. 19

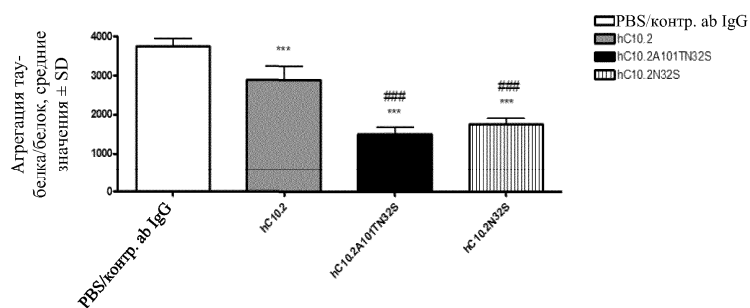
Вариант	% дезамидирования в пептиде LC:T2 (28 дней при 40°C)
D55E N32Q	0
wt	50
D55E N32S	0
D55E	40
N32Q	0
N32S	0
A101T N32Q	0
A101T N32S	0
A101T	93

Фиг. 20

Индуктированное P3 затравочное действие

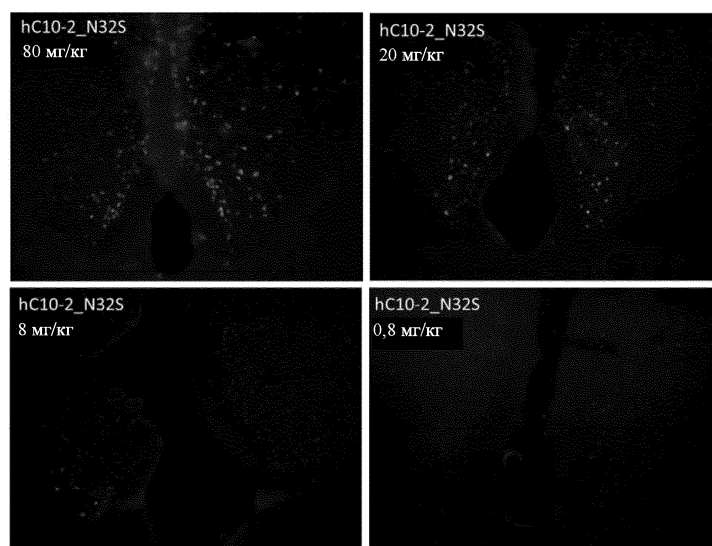


Индуктированное S1p затравочное действие

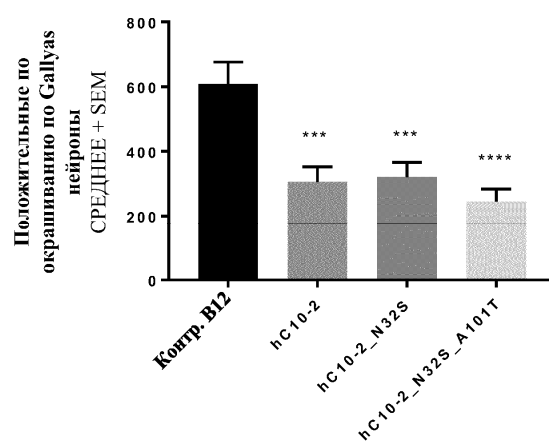


Фиг. 21

Передняя поясная кора головного мозга



Фиг. 22



Фиг. 23

