

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392631 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.23

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

(22) Дата подачи заявки
2022.03.25

(54) АНТИТЕЛА К ТАУ-БЕЛКУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/166,439; 63/196,365

(32) 2021.03.26; 2021.06.03

(33) US

(86) PCT/IB2022/052765

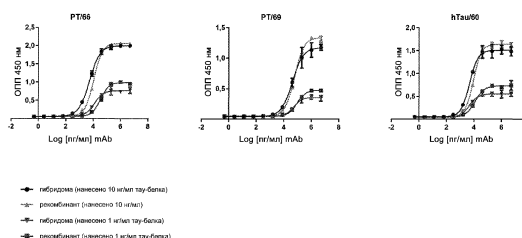
(87) WO 2022/201123 2022.09.29

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Нанджунда Рупеш, Ван Колен
Кристоф (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Описаны моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты к РНФ-тау. Также описаны кодирующие антитела нуклеиновые кислоты, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики таких патологических состояний, как таупатия.



A1

202392631

202392631

A1

[0001] АНТИТЕЛА К ТАУ-БЕЛКУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящая заявка относится к антителам к РНФ-тау, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим такие антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим такие векторы, и композициям, содержащим такие антитела. Также предложены способы получения антител, способы применения антител для лечения патологических состояний, включая таупатии, и способы применения антител для диагностики заболеваний, таких как таупатии.

10

15

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ
В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0003] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который подается в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла «065768.96US2_Sequence_Listing» и датой создания 3 июня 2021 г., размер 66 Кб. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой дегенеративное расстройство мозга, клинически характеризуемое прогрессирующей потерей памяти, когнитивных функций, способности к рассуждению, принятию решений и эмоциональной устойчивости, что постепенно приводит к глубокому умственному нарушению и в конечном итоге смерти. БА является очень частой причиной прогрессирующего умственного угасания (деменции) у пожилых людей и считается четвертой по частоте медицинской причиной смерти в США. БА наблюдается в различных этнических группах по всему миру и является сегодня и останется в будущем одной из основных проблем здравоохранения.

25

30

[0005] В мозге пациентов с БА наблюдаются характерные повреждения, называемые сенильными (или амилоидными) бляшками, амилоидной ангиопатией (амилоидными отложениями в кровеносных сосудах) и нейрофибриллярными клубками. У пациентов с БА обычно обнаруживают большие количества таких повреждений, в особенности амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков из парных спиральных филаментов, в нескольких областях мозга человека, важных для памяти и когнитивных функций.

[0006] На данный момент лечение БА включает только лекарственные препараты, одобренные для лечения когнитивных симптомов у пациентов с деменцией. Не существует одобренных лекарственных препаратов, которые модифицируют или замедляют прогрессирование БА. Потенциальные модификаторы заболевания представляют собой анти-амилоидные антитела, включая Eli Lilly's Donanemab, гуманизированное моноклональное антитело IgG1, распознающее A β (p3-42), пироглутаматную форму A β , и адуканумаб, человеческое моноклональное антитело IgG1 к конформационному эпитопу, обнаруженному на A β . Эти лекарственные препараты и большинство других потенциальных модификаторов заболевания, которые могут выпускаться в следующем десятилетии, нацелены на A β (главный компонент амилоидных бляшек, которые являются одним из двух «отличительных» патологических признаков БА).

[0007] Нейрофибриллярные клубки, второй отличительный патологический признак БА, главным образом состоят из агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка. Главной физиологической функцией тау-белка является полимеризация и стабилизация микротрубочек. Связывание тау-белка с микротрубочками происходит за счет ионных взаимодействий между положительными зарядами в области связывания тау-белка с микротрубочками и отрицательными зарядами на сетке микротрубочек (Butner and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991). Тау-белок содержит 85 возможных сайтов фосфорилирования, а фосфорилирование по многим из этих сайтов препятствует основной функции тау-белка. Тау-белок, связанный с сеткой аксональных микротрубочек, находится в состоянии гипофосфорилирования, тогда как агрегированному тау-белку при БА свойственны гиперфосфорилированность и формирование уникальных эпитопов, отличающихся от физиологически активного пула тау-белка.

[0008] Описана гипотеза о передаче и распространении таупатии, и она основана на стадиях развития в человеческом мозге таупатии по Брааку и таупатии,

распространяющейся после инъекций агрегатов тау-белка в доклинических моделях таупатии (Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009; Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009).

[0009] Разработка терапевтических средств для профилактики или

противодействия агрегации тау-белка уже многие годы вызывает большой интерес и потенциальные препараты, включая противодействующие агрегации соединения и ингибиторы киназы, достигли стадии клинических испытаний (Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov.* 8:783-93, 2009). Были опубликованы несколько исследований, которые демонстрируют полезные терапевтические эффекты как активной, так и пассивной иммунизации тау-белком в моделях трансгенных мышей (Chai et al., *J Biol Chem.* 286:34457-67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurochem.* 118:658-67, 2011; Boutajangout et al., *J Neurosci.* 30:16559-66, 2010; Asuni et al., *J Neurosci.* 27:9115-29, 2007). Сообщалось об активности как фосфонаправленных, так и нефосфонаправленных антител (Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 11(1):9-25, 2016).

[0010] Несмотря на прогресс, остается потребность в эффективных терапевтических средствах, которые предотвращают агрегацию тау-белка и прогрессирование таупатии для лечения таупатий, таких как БА, и других нейродегенеративных заболеваний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Настоящая заявка удовлетворяет эту потребность, предоставляя антитела к PHF-тау или их антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают высокой аффинностью связывания к парным спиральным филаментам (PHF)-тау и являются селективными для фосфорилированного тау. Антитела настоящей заявки были получены путем адаптации для человеческого каркаса (HFA) мышечных PHF-тау-специфических антител. Считается, что селективность антител для фосфорилированного тау-белка обеспечивает эффективность против патогенного тау-белка без нарушения нормальной функции тау-белка. В настоящей заявке также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, композиции, содержащие такие антитела, и способы получения и применения таких антител. Антитела к PHF-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки ингибируют агрегаты тау-белка, что измерено с помощью клеточных анализов с использованием агрегатов тау-белка, полученных из лизатов клеток НЕК или из

лизатов спинного мозга мутантных тау-трансгенных мышей. Кроме того, химерное антитело с переменными областями антител к PHF-тау настоящей заявки и константными областями мышинового Ig, такими как константные области мышинового IgG2a, блокируют активность агрегирования в *in vivo* мутантной тау-трансгенной мышинной модели.

[0012] Прогрессирование таупатии в головном мозге при БА следует отчетливым особым схемам распространения. Было показано, что в доклинических моделях внеклеточные агрегаты фосфо-тау-белка могут индуцировать таупатию в нейронах (Clavaguera et al., PNAS 110(23):9535-40, 2013). Таким образом, считается, что таупатия может распространяться подобно прионам от одной области головного мозга к другой. Этот процесс распространения может включать в себя экстернализацию агрегатов тау-белка, которые могут захватываться близлежащими нейронами и могут индуцировать дальнейшую таупатию. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, считается, что антитела к PHF-тау или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки предотвращают агрегацию тау-белка или распространение таупатии в головном мозге путем взаимодействия с агрегатами фосфо-тау-белка.

[0013] В одном общем аспекте заявка относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают PHF-тау-белок.

[0014] В другом общем аспекте заявка относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка.

[0015] В соответствии с конкретным аспектом данная заявка относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором:

- (a) эпитоп тау-белка содержит любой из фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;
- (b) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит ни одного из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;

(с) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427 и фосфорилированного S433 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S435 и не содержит ни один из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435; или

5 (d) эпитоп тау-белка содержит фосфорилированный T427 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435.

[0016] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- 10 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;
- 15 (b) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;
- 20 (с) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 27, 18 и 19 соответственно;
- 25 (d) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 35 соответственно; или
- (e) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 43 соответственно.

[0017] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

[0018] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

[0019] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3;
- (b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;
- (c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23;
- (d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; или
- (e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0020] В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11;
- (b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21;
- (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29;
- (d) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37; или

- (е) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0021] В другом общем аспекте заявка относится к выделенному моноклональному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим:

- 5 (а) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;
- 10 (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; или
- (с) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11.

[0022] В другом общем аспекте заявка относится к выделенному моноклональному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим:

- 15 (а) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;
- 20 (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; или
- (с) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21.

25 **[0023]** В другом общем аспекте заявка относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки.

[0024] В другом общем аспекте заявка относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки.

30 **[0025]** В другом общем аспекте заявка относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки.

[0026] В другом общем аспекте заявка относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки и фармацевтически приемлемый носитель.

[0027] В другом общем аспекте заявка относится к способу блокирования

5 агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[0028] В другом общем аспекте заявка относится к способу лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки. Таупатия включает в себя, без ограничений, одно или

10 более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием
15 нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, синдрома Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдрома Галлервордена — Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейтцфельда — Якоба,
20 множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции
25 боксеров).

[0029] В другом общем аспекте заявка относится к способу снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции

30 настоящей заявки. Таупатия включает в себя, без ограничений, одно или более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, синдрома Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием

нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, синдрома Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдрома

- 5 Галлервордена — Шпатца, миозита с включениями, болезни Крейтцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитического паркинсонизма, 10 хронической травматической энцефалопатии и *dementia pugilistica* (деменции боксеров).

[0030] В другом общем аспекте заявка относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, 15 кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или из клеточной культуры.

- [0031]** В другом общем аспекте заявка относится к способу обнаружения 20 присутствия РНФ-тау-белка во взятой у субъекта биологической пробе, включающему приведение биологической пробы в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом настоящей заявки и обнаружение связывания моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау во взятой у субъекта пробе. Биологическая проба включает, помимо прочего, одно или 25 более выбранное из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

- [0032]** Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения в соответствии с вариантами осуществления заявки станут очевидны из представленного ниже описания, включая подробное описание заявки и ее предпочтительных вариантов 30 осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0033] Вышеупомянутое краткое изложение, а также последующее подробное описание заявки станут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми

графическими материалами. Необходимо понимать, что заявка не ограничена точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

[0034] На **ФИГ. 1** показано связывание рекомбинантно экспрессированных РТ66, РТ69/РТ87, hTau60 с рекомбинантным 2N4R-тау-белком, проанализированным методом ИФА.

[0035] На **ФИГ. 2** показаны полученные методом вестерн-блоттинга профили РТ66, hTau60 и РТ69/РТ87 в следующих образцах (слева направо): экстракты головного мозга мыши дикого типа (слот 1) и мыши тау -/- (слот 2), экстракт головного мозга собаки (слот 3), экстракт головного мозга обезьяны (слот 4), экстракт головного мозга человека (слот 5) и препарат РНФ, полученный из головного мозга пациента с БА после вскрытия (слот 6).

[0036] На **ФИГ. 3** показаны репрезентативные полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) данные по связыванию моноклональных антител (mAb) РТ66, hTau60 и РТ69/РТ87 с РНФ-тау-белком и их соответствующих Fab-фрагментов с РНФ-тау-белком и рекомбинантным тау-белком. Полученные методом ППР сенсограммы связывания антител к тау-белку и их соответствующих Fab-фрагментов, нацеленных против РНФ-тау-белка и полноразмерного рекомбинантного тау-белка. Отдельные дорожки на каждой сенсограмме представляют разные концентрации инъецированных антител или Fab-фрагментов. Отдельные дорожки от верхней до нижней соответствуют концентрациям 75 нМ, 15 нМ, 3 нМ, 0,6 нМ и 0,12 нМ. Для НТ7 верхняя дорожка (концентрация) соответствует 15 нМ. Полужирные черные линии указывают на общую кинетику, соответствующую модели двухвалентного анализатора (для mAb с РНФ-тау-белком) или модели Ленгмюра в соотношении 1 : 1 (для Fab с РНФ-тау-белком и рекомбинантным тау-белком). Для НТ7 Fab-фрагмент недоступен.

[0037] На **ФИГ. 4** представлены данные по связыванию для криосрезов головного мозга пациентов с/без БА для РТ66, hTau60 и РТ69/РТ87.

[0038] На **ФИГ. 5** представлены данные иммуногистохимического профилирования РТ66, hTau60 и РТ69/РТ87. Представлено связывание на парафиновых срезах мышечной ткани дикого типа, тау -/- и Р301S.

[0039] На **ФИГ. 6А** показано схематическое изображение анализа иммунодеплеции.

[0040] На **ФИГ. 6Б** показаны результаты анализа иммунодеплеции тестовых антител (hTau60, РТ69, РТ66 и тау-агрегатов внутреннего N-концевого связывающегося

с тау-белком mAb (PT26), полученных из ткани головного мозга человека с БА (квадрат) и спинного мозга P301S (треугольник). PT66, hTau60 и PT69/PT87 более эффективно подавляли агрегирование тау-белка по сравнению с N-концевым антителом, как показано с использованием FRET-анализа. Иммунодеплетированные фракции гомогенатов головного мозга человека с БА также исследовали методом MSD-анализа, специфического к агрегатам тау-белка hTau60/hTau60 (круг).

[0041] На **ФИГ. 6В** показаны результаты анализа последовательного анализа иммунодеплеции (ID), причем первый цикл анализа иммунодеплеции (ID1) проводили с каждым из антител PT93 (нацеленным на N-концевую часть тау-белка), pT51 (HT7-подобное антитело) и hTau60 (нацеленным на C-концевую часть тау-белка) или без какого-либо антитела (без mAb), а второй цикл анализа иммунодеплеции (ID2) проводили с тем же антителом, что и в случае ID1, или с другим. Было показано, что ID2 с одним и тем же антителом, который был использован для ID1, не приводит к истощению дополнительных агрегатов и что ID1 с PT93, ID2 с PT51 (HT7-подобным) и hTau60 (C-концевым) приводит к дополнительному истощению агрегатов тау-белка, причем hTau60 приводит к истощению всех оставшихся агрегатов.

[0042] На **ФИГ. 7А** показана эффективность hTau60 и PT69/PT87 по сравнению с антителами AT120, PT76 и PT53 в модели инъекции ePHF (см., например, патент США № 10,766,953) при одновременном введении PHF-тау-белков и тестовых антител. ***
P < 0,0001 для множественных сравнений Бонферрони.

[0043] На **ФИГ. 7Б** показаны результаты анализа эффективности антител, связывающихся с C-концевой частью PHF-тау-белка (C-конец) PT81 и PT66 по сравнению с антителами, которые связываются с другими эпитопами, находящимися в N-концевой части (на N-конце) или в средней части (в середине) тау-белка, в модели инъекции ePHF. Для C-концевых антител показано сильное снижение агрегирования тау-белка *in vivo*.

[0044] На **ФИГ. 7В** показано, что оба C-концевых антитела (PT66 и hTau60) и PT3 сохраняли активность *in vivo* после интраперитонеального введения. Мышам вводили антитело в дозе 20 мг/кг 2 раза в неделю.

[0045] На **ФИГ. 8** показаны данные картирования эпитопов с использованием линейного пептидного картирования внутренних C-концевых антител.

[0046] На **ФИГ. 9** показано, что более низкая эффективность N-концевых антител может быть обусловлена более интенсивным процессингом на N-конце PHF-тау-белка: C-концевые антитела к PHF-тау-белку PT66 и hTau60 (C-конец) сравнили с N-

концевыми антителами к PHF-тау-белку (PT93) при проведении скрининга методом вестерн-блоттинга с анализом PHF-тау-белка.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 5 **[0047]** В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий или т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для заявки. Такое
- 10 описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.
- Определения*
- 15 **[0048]** Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому рядовому специалисту в области, к которой относится данная заявка. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы
- 20 они были полностью изложены в настоящем документе. Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает в себя объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.
- 25 **[0049]** Если не указано иное, любое числовое значение, такое как концентрация или диапазон концентраций, описанное в настоящем документе, следует понимать как модифицированное во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11%
- 30 (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

[0050] В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

[0051] В тексте данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как означающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в настоящем документе термин «содержащий» может быть заменен термином «вмещающий» или «включающий в себя» или иногда при применении в настоящем документе может быть заменен термином «имеющий».

[0052] При применении в настоящем документе термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в элементе формулы изобретения. При применении в настоящем документе термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любые из вышеупомянутых терминов «содержащий», «состоящий из», «включающий» и «имеющий» при применении в настоящем документе в контексте аспекта или варианта осуществления заявки могут быть заменены термином «состоящий из» или «состоящий по существу из» для варьирования объемов описания.

[0053] Используемый в настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые

кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

[0054] В контексте данного документа термин «антитело» или «иммуноглобулин» используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антитела.

[0055] В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Антитела настоящей заявки включают в себя антитела, которые имеют вариации в своей области Fc, так что они обладают измененными свойствами по сравнению с областями Fc дикого типа, включая, без ограничений, увеличенный период полужизни, уменьшенную или увеличенную ADCC или CDC, а также сайленсированные эффекторные функции Fc. Соответственно, антитела настоящей заявки могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела настоящей заявки предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа и лямбда. Соответственно, антитела настоящей заявки могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела настоящей заявки включают в себя константные области тяжелой и/или легкой цепи из мышинных антител или человеческих антител.

[0056] В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат переменные области легкой и тяжелой цепей. Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из «каркасной» области, прерываемой

«антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определяют с использованием различных терминов и схем нумерации, описанных ниже.

- (i) Kabat: «определяющие комплементарность области» или «CDR» основаны на
5 вариабельности последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50,
1970). Антигенсвязывающий участок по существу имеет три CDR в каждой
вариабельной области (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариабельной
области тяжелой цепи (VH) и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариабельной области
легкой цепи (VL));
- (ii) Chothia: термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV», относится к
10 областям вариабельного домена антитела, которые гипервариабельны по
структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *J Mol Biol.*
196:901-17, 1987). Антигенсвязывающий сайт по существу имеет по три
гипервариабельные области в каждой из вариабельных областей тяжелой цепи
VH (H1, H2, H3) и легкой цепи VL (L1, L2, L3). Системы нумерации, а также
15 аннотации CDR и HV были пересмотрены Abhinandan и Martin (Abhinandan and
Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008).
- (iii) IMGT: другое определение областей, образующих антигенсвязывающий сайт,
было предложено Lefranc (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003), на
основании сравнения V-доменов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов.
20 В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) представлены
стандартизированная нумерация и определение этих областей. Соответствие
между разграничениями CDR, HV и IMGT описано Lefranc et al., 2003, *Id.*;
- (iv) AbM: компромисс между схемами нумерации по Кабату и Чотиа представляет
собой соглашение по нумерации AbM, описанное Martin (Martin ACR (2010)
25 Antibody Engineering, eds Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Vol 2,
pp 33–51).
- (v) Антигенсвязывающий сайт может также быть определен по «Specificity
Determining Residue Usage» (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004),
в которой в качестве SDR представлены аминокислотные остатки
30 иммуноглобулина, которые непосредственно участвуют в контакте с антигеном.

[0057] Термины «каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой оставшиеся последовательности вариабельной области антитела, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Поскольку конкретное определение антигенсвязывающего сайта может быть сформулировано на

основе разных признаков, как описано выше, конкретная каркасная последовательность зависит от определения антигенсвязывающего сайта. Каркасные области (FR) представляют собой более высоко консервативные участки переменных доменов.

Каждый из переменных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (соответственно FR1, FR2, FR3 и FR4), которые по существу принимают конфигурацию бета-листов, соединенных тремя гиперпеременными петлями.

Гиперпеременные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гиперпеременными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990). Несмотря на

высокую переменность последовательности пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемый «каноническими структурами». Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации основной цепи.

[0058] При использовании в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент константной области тяжелой

цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0059] В настоящем документе термин «гуманизированное антитело» относится к нечеловеческому антителу, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в человеческом теле уменьшается.

[0060] При использовании в настоящем документе термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как структура эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

[0061] В настоящем документе термин «тау» или «тау-белок» относится к встречающемуся в избытке белку центральной и периферической нервной системы, имеющему множество изоформ. В центральной нервной системе (CNS) человека существует шесть основных изоформ тау-белка, имеющих длину от 352 до 441 аминокислот, обусловленных альтернативным сплайсингом (Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009). Изоформы отличаются друг от друга регулируемым включением 0–2 N-концевых вставок и 3 или 4 tandemно организованных повторов связывания с микротрубочками и получили названия 0N3R (SEQ ID NO: 46), 1N3R (SEQ ID NO: 47), 2N3R (SEQ ID NO: 48), 0N4R (SEQ ID NO: 49), 1N4R (SEQ ID NO: 50) и 2N4R (SEQ ID NO: 51). В настоящем документе термин «контрольный тау-белок» относится к изоформе тау-белка с SEQ ID NO: 51, в которой отсутствуют фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин «тау-белок» включает белки, содержащие мутации, например точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и варианты сплайсинга полноразмерного тау-белка

дикого типа. Термин «тау-белок» включает также пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности тау-белка. К пост-транскрипционной модификации относится, без ограничений, фосфорилирование. В настоящем документе фраза «фосфорилированный S433 тау-белка» и аналогичные фразы относятся к

5 фосфорилированной аминокислоте в определенном положении, например серину в положении 433, полноразмерного тау-белка дикого типа.

[0062] Тау-белок связывается с микротрубочками и регулирует транспорт карго через клетки, процесс, который можно модулировать фосфорилированием тау-белка. В БА и связанных расстройствах аномальное фосфорилирование тау-белка является

10 доминирующим и считается предшественником и/или инициатором агрегации тау-белка в фибриллы, получившие название парных спиральных филаментов (PHF). Основным компонентом PHF является гиперфосфорилированный тау-белок. В контексте настоящего документа термин «тау парных спиральных филаментов» или «PHF-тау» относится к тау-агрегатам в парных спиральных филаментах. В электронной

15 микроскопии явно проявляются две основные области в структуре PHF: рыхлая оболочка и центральный филамент; при этом рыхлая оболочка чувствительна к протеолизу и расположена снаружи филаментов, а устойчивое к протеазе ядро филаментов образует каркас PHF (Wisshik et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4884-8, 1988).

[0063] Под «выделенным моноклональным антителом, которое связывается с PHF-тау-белком» или «выделенным моноклональным антителом к PHF-тау-белку» в настоящем документе подразумевают моноклональное антитело к PHF-тау-белку, которое по существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное моноклональное антитело к PHF-тау-белку по

25 существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от PHF-тау-белка). Однако выделенное моноклональное антитело к PHF-тау-белку может обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например с антигенами других биологических видов (например, с видовыми гомологами PHF-тау-белка).

[0064] При использовании в настоящем документе термин «специфически связывает» или «специфическое связывание» относится к способности антитела к PHF-тау настоящей заявки связываться с предварительно заданной мишенью с константой (K_D) диссоциации около 1×10^{-6} М или теснее, например около 1×10^{-7} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее,

30

около 1×10^{-11} М или менее, около 1×10^{-12} М или менее или около 1×10^{-13} М или менее. KD представляет собой отношение K_d к K_a (т. е. K_d / K_a) и выражается в молярной концентрации (М). Значения KD для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, значение KD для антитела к РНФ-тау может быть определено с помощью

поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием биосенсорной системы, например системы Biacore®, прибора ProteOn (BioRad), прибора KinExA (Sapidyne), ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Как правило, антитело к РНФ-тау связывается с предварительно заданной мишенью (т. е. РНФ-тау) с K_D , которая по меньшей мере в десять раз меньше его K_D для неспецифической мишени по результатам измерений методом

поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, прибора ProteOn (BioRad). Однако антитела к РНФ-тау, специфически связывающиеся с РНФ-тау, могут иметь перекрестную реактивность с другими родственными мишенями, например с той же предварительно заданной мишенью, но от другого биологического вида (гомологи).

[0065] В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило,

встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

[0066] В настоящем документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

[0067] Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты настоящей заявки. Термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты настоящей заявки. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0068] Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают РНФ-тау, могут находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для выращивания клеточной культуры, или могут быть прикреплены к клеточной мембране.

[0069] В настоящем документе термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солубилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативного влияния на эффективность композиции в

соответствии с настоящей заявкой или биологическую активность композиции в соответствии с настоящей заявкой. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

[0070] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0071] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы *in vitro*. Подбор конкретной эффективной дозы может выполнить (например, путем клинических исследований) специалист в данной области с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы, массу тела пациента, состояние иммунной системы пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и степени тяжести заболевания и должна быть определена на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделей.

[0072] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с таупатией, который не обязательно замечен у субъекта, но может быть замечен у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления

термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с таупатией. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

10 **[0073]** При применении в настоящем документе термин «таупатия» охватывает любые нейродегенеративные заболевания, которые связаны с патологической агрегацией тау-белка в мозге. Наряду с наследственной и спорадической БА к другим примерам таупатии относятся лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция с аргирофильными зернами, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, болезнь Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезнь Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда — Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна — Пика типа C, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская мотонейронная болезнь с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитный паркинсонизм и хроническая травматическая энцефалопатия, такая как dementia pugilistica (деменция боксеров) (Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011).

25 **[0074]** Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более чем одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения субъекту лекарственных средств. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед введением (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов,

12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства субъекту или одновременно с таким введением.

Антитела к PHF-тау

- 5 **[0075]** В одном общем аспекте заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают PHF-тау. Такие антитела к PHF-тау могут обладать свойством связываться с фосфорилированным эпитопом на PHF-тау или связываться с нефосфорилированным эпитопом на PHF-тау. Антителам к PHF-тау могут найти применение в качестве
- 10 терапевтических агентов и в качестве исследовательских или диагностических реагентов для определения PHF-тау в биологических пробах, например в тканях или клетках.
- [0076]** В соответствии с конкретным аспектом заявка относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тау-белком
- 15 на эпитопе в С-концевом домене тау-белка. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, имеющем аминокислотную последовательность или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают
- 20 PHF-тау, предпочтительно PHF-тау человека. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают PHF-тау, предпочтительно
- 25 PHF-тау человека.
- [0077]** В некоторых вариантах осуществления эпитоп тау-белка содержит любой из фосфорилированного S433 или фосфорилированный S435 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435; или эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и
- 30 фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит ни одного из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435; или эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427 и фосфорилированного S433 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S435 и не содержит ни один из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и

фосфорилированного S435; или эпитоп тау-белка содержит фосфорилированный T427 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435.

[0078] Антитела настоящего изобретения могут быть получены с помощью различных методик, например с помощью метода гибридомы (Kohler and Milstein,

- 5 *Nature*. 256:495-7, 1975). Химерные моноклональные антитела, содержащие вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, полученные из донорского антитела (как правило, мышинового) в комбинации с константными областями легкой и тяжелой цепей, полученными из акцепторного антитела (как правило, другого вида млекопитающих, такого как человек), могут быть получены способом, описанным в
- 10 US4816567. Моноклональные антитела с привитой областью CDR, имеющие CDR из донорского иммуноглобулина, не относящегося к человеку (как правило, мышинового), и оставшиеся производные от иммуноглобулина части молекулы, происходящие от одного или более иммуноглобулинов человека, могут быть получены методиками, известными специалистам в данной области, такими как описанные в US5225539.
- 15 Полностью человеческие моноклональные антитела, в которых отсутствуют какие-либо нечеловеческие последовательности, можно получать из трансгенных по человеческим иммуноглобулинам мышей по методикам, описанным Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994; Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996; и Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997. Человеческие моноклональные антитела также могут быть получены и
- 20 оптимизированы из библиотек фаговых дисплеев (см., например, Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001; Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010).

[0079] В соответствии с конкретным аспектом заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- 25 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;
- (b) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие
- 30 полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;
- (c) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно; и

- участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 27, 18 и 19 соответственно;
- (d) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно; и
- 5 участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 35 соответственно; или
- (e) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно; и
- 10 участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 43 соответственно.

[0080] В данном документе представлены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариабельную область легкой цепи,

15 имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариабельную область легкой цепи, имеющую

20 полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности

25 SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

[0081] В соответствии с конкретным аспектом заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%,
- 30 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31; или

(e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39.

[0082] В соответствии с другим конкретным аспектом заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- 5 (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;
- 10 (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23;
- 15 (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; или
- 20 (e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39.

[0083] В соответствии с другим конкретным аспектом заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- 25 (a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;
- 30 (b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21;

(с) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29;

(d) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37; или

(е) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90%, например по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

[0084] В соответствии с другим конкретным аспектом заявка относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

(а) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11;

(b) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21;

5 (c) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29;

(d) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37; или

10 (e) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0085] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки содержат:

15 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие, предпочтительно состоящие из, полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие, предпочтительно состоящие из, полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

20 (b) переменную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; или

25 (c) тяжелую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11.

[0086] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки содержат:

30 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие, предпочтительно состоящие из, полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие, предпочтительно состоящие из, полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую, предпочтительно состоящую из, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; или

5 (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21.

[0087] В соответствии с другим конкретным аспектом заявка относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с PHF-тау-белком с константой диссоциации (KD) 5×10^{-9} М или менее, предпочтительно KD 1×10^{-9} М или менее или 1×10^{-10} М или менее, при этом KD измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, например с использованием системы Biacore или ProteOn.

[0088] Функциональная активность моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с PHF-тау-белком, может быть охарактеризована с использованием методов, известных в данной области техники и описанных в данном документе. Способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с PHF-тау, включают, но не ограничиваются ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, твердофазный ИФА и цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS); иммуногистохимический анализ; анализы клеток *in vitro* и анализы с инъекциями *in vivo* для определения эффективности антител при ингибировании агрегирования тау-белка; анализы на клеточную цитотоксичность для обнаружения наличия антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) и активности комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) антител; и т. д. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы определения характеристик антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с PHF-тау, включают способы, описанные в приведенных ниже примерах. Примером мышинового родительского антитела моноклональных антител, связывающего PHF-тау, но не контрольный тау-белок, является антитело РТЗ, которое описано в патенте США № 9,371,376, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[0089] Для определения связывания эпитопа антител настоящей заявки могут быть задействованы несколько хорошо известных методологий. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in*

silico прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела для картирования участков антигена, связывающихся с антителом. Для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот может быть применен сегментный и точечный мутагенез антигена. Для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа, применяется со-кристаллическая структура комплекса антитело-антиген. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы определения связывающего эпитопа антител настоящей заявки включают описанные в примерах ниже.

[0090] Антитела настоящей заявки могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Пример биспецифического антитела может связывать два отдельных эпитопа на РНФ-тау или может связывать РНФ-тау и бета-амилоид (Abeta). Другой пример биспецифического антитела может связывать РНФ-тау и трансцитозный рецептор эндогенного гематоэнцефалического барьера, такой как инсулиновый рецептор, рецептор трансферрина, инсулиноподобный фактор роста-1 и рецептор липопротеинов. Пример антитела представляет собой антитело типа IgG1.

[0091] Иммуноэффекторные свойства антител настоящей заявки также могут быть усилены или приглушены за счет модификаций Fc с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc, ответственными за эти действия. Мутировавшие остатки в Fc-домене, увеличивающие период полужизни антител, могут также улучшать фармакокинетические свойства (Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20:685-91, 2009).

[0092] Кроме того, антитела настоящей заявки могут быть модифицированы пост-трансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или не встречающаяся в природе ковалентная модификация, такая как добавление фрагментов полиэтиленгликоля, и липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела настоящей заявки могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пегилированы) для улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методами,

известными специалистам в данной области. Было показано, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ усиливает их фармакодинамику и при этом не изменяет функцию (Knight et al., *Platelets*. 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine*. 16:106-19, 2001; Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003)

- 5 **[0093]** В другом общем аспекте заявка относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т. п.) без изменения аминокислотной последовательности белка.
- 10 Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты настоящей заявки, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков. Примеры выделенных полинуклеотидов представляют собой полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие тяжелые
- 15 и легкие цепи иммуноглобулина, описанные в примерах (например, SEQ ID NO: 10, 11, 20, 21, 28, 29, 36, 37, 44, 45), и полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие переменные области тяжелой цепи (VH) и переменные области легкой цепи (VL) (например, SEQ ID NO: 2, 3, 12, 13, 22, 23, 30, 31, 38, 39). Другие полинуклеотиды, которые с учетом вырождения генетического кода или
- 20 предпочтительности применения кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела настоящей заявки, также находятся в пределах объема настоящей заявки. Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получить с применением хорошо известных рекомбинантных или синтетических методов. Кодирующие моноклональные антитела ДНК легко выделяются и секвенируются с
- 25 применением способов, известных специалистам в данной области. При получении гибридомы такие клетки могут служить источником такой ДНК. В альтернативном варианте осуществления можно использовать дисплейные методики, в которых кодирующая последовательность и продукт трансляции соединены, например библиотеки фаговых или рибосомных дисплеев.
- 30 **[0094]** В другом общем аспекте заявка относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах

осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плаزمид. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения в клетке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора в соответствии с вариантами осуществления настоящей заявки можно использовать традиционные методики клонирования или синтеза искусственных генов.

[0095] В другом общем аспекте заявка относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящей заявки можно применять любую клетку-хозяина, известную специалистам в данной области. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, бактериальные клетки, растительные клетки или клетки архей. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают immortalized клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышечные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1 SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) или DG44.

[0096] В другом общем аспекте заявка относится к способу продуцирования моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки, включающему культивирование клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента настоящей заявки, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта).

Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с традиционными способами, известными в данной области.

Фармацевтические композиции и способы лечения

[0097] Антитела к RHF-тау настоящей заявки или их фрагменты настоящей заявки можно использовать для лечения, уменьшения или предотвращения симптомов у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, которое предполагает патологическую агрегацию тау-белка в мозге или таупатию, например у пациентов, страдающих от БА.

[0098] Таким образом, в другом общем аспекте заявка относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки и фармацевтически приемлемый носитель.

[0099] В другом общем аспекте заявка относится к способу блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки. Используемый в настоящем документе термин «агрегат тау-белка» относится к агрегату тау-белка, способному зарождать или «засеивать» внутриклеточную агрегацию тау-белка при интернализации клеткой или при воздействии мономерного тау-белка *in vitro*. Активность агрегирования тау можно оценивать в анализах агрегации клеток тау-белка, как описано в настоящем документе (см. также, например, патент США № 9,834,596, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки).

[00100] В другом общем аспекте заявка относится к способу лечения или уменьшения симптомов заболевания, расстройства или состояния, такого как таупатия, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[00101] В другом общем аспекте заявка относится к способу снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции настоящей заявки.

[00102] В соответствии с вариантами осуществления заявки фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество моноклонального

антитела к РНФ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемое в данном документе со ссылкой на моноклональные антитела к РНФ-тау или их антигенсвязывающие фрагменты терапевтически эффективное количество означает количество моноклонального антитела к РНФ-тау или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращение или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния; или уменьшения или полного облегчения симптомов, связанных с иммунным заболеванием, расстройством или состоянием.

[00103] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (xi) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[00104] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, подлежащее лечению, представляет собой таупатию. В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, включает в себя, без ограничений,

наследственную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменцию с преобладанием

5 нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменцию, характеризующуюся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдром Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезни Крейцфельда — Якоба,

10 множественную системную атрофию, болезнь Ниманна — Пика типа С, церебральную амилоидную ангиопатию с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническую дистрофию, негуамскую болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническую травматическую энцефалопатию или *dementia pugilistica* (деменцию

15 боксеров).

[00105] Связанный с таупатией поведенческий фенотип включает в себя, без ограничений, нарушения когнитивных функций, ранние изменения личности и расторможенность, апатию, патологическое безволие, задержку речи, нарушение целенаправленных движений, навязчивое повторение, стереотипные

20 движения/поведение, гиперорализм, дезорганизацию, неспособность планировать или организовать последовательные задачи, эгоизм/черствость, антисоциальные черты, отсутствие эмпатии, запинание, аграмматическую речь с частыми парафазийными ошибками, но относительной сохранностью понимания, нарушение восприятия и трудности в подборе слов, медленно прогрессирующую неустойчивость походки,

25 ретропульсию, застывание, частые падения, нечувствительную к леводопе аксиальную ригидность, супрануклеарный парез взора, прямоугольные саккадические осцилляции взора, медленные вертикальные саккады, псевдобульбарный синдром, апраксию конечностей, дистонию, кортикальную потерю чувствительности и тремор.

[00106] К подлежащим лечению пациентам относятся, без ограничений, не

30 имеющие симптомов лица, подверженные риску БА или иной таупатии, а также пациенты, имеющие выраженные симптомы. Подлежащие лечению пациенты включают лиц, у которых имеется известный генетический риск БА, например присутствие заболевания в семейном анамнезе, или наличие генетических факторов риска в геноме. Примерами факторов риска являются мутации в белке-

предшественнике амилоида (APP), особенно в положении 717 и положениях 670 и 671 (мутации Hardy и Swedish соответственно). Другими факторами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, и в ApoE4, присутствие в семейном анамнезе гиперхолестеролемии или атеросклероза. Лиц, в настоящее время страдающих от БА, можно отличить от лиц с характерной деменцией по наличию описанных выше факторов риска. Кроме того, для выявления лиц, имеющих БА, имеется ряд диагностических тестов. Среди них — измерение уровней тау-белка и Abeta 42 в спинномозговой жидкости. Повышенный уровень тау-белка и пониженный уровень Abeta 42 указывают на наличие БА. Лиц, страдающих БА также можно диагностировать по критериям Ассоциации болезни Альцгеймера и связанных расстройств (AD and Related Disorders Association).

[00107] Антитела к PHF-тау настоящей заявки можно применять как в качестве терапевтических, так и профилактических средств для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, которые связаны с патологической агрегацией тау-белка, таких как БА или иные таупатии. Для не имеющих симптомов пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, приблизительно в 10, 15, 20, 25, 30 лет). Однако обычно необходимость в начале лечения не возникает, пока пациент не достигнет возраста приблизительно 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение, как правило, включает введение множества доз в течение некоторого периода времени. Ход лечения можно контролировать путем измерения ответа на терапевтический агент во времени по антителам или активированным Т-клеткам или В-клеткам. При падении ответа могут быть показаны повторные дозы.

[00108] В профилактических приложениях фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, уязвимому к или иным образом подверженному риску БА в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения степени тяжести или задержки начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие в процессе развития заболевания. В терапевтических приложениях композиции или лекарственные средства вводят пациенту, у которого подозревается или уже подтверждено наличие такого заболевания в мере, достаточной для ослабления, прекращения или задержки развития любого из симптомов заболевания (биохимического, гистологического и/или поведенческого). Введение терапевтического агента может уменьшать или устранять

умеренные нарушения когнитивных функций у пациентов, у которых еще не развилась характерная патология Альцгеймера.

[00109] Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

[00110] Антитела настоящей заявки можно получать в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию можно проводить с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты для регулирования и буферизации pH, стабилизаторы, загустители, увлажняющие и красящие агенты и т. п. Концентрация антител настоящей заявки в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т. е. от менее около 0,5%, обычно или по меньшей мере около 1%, и до 15 или 20% по массе, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т. п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

[00111] Для введения предназначенных для терапевтического применения антител настоящей заявки можно применять любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяин. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены с обеспечением их приемлемости для парентерального введения, например интрадермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, интраназального или

интракраниального, или их можно вводить в спинномозговую жидкость головного или спинного мозга.

[00112] Введение можно осуществлять по схеме с единственной дозой или по схеме со множеством доз, при которой основной курс лечения может включать 1–10

5 отдельных доз, после чего следуют другие дозы, вводимые в последующие временные интервалы, необходимые для поддержания и/или усиления ответа, например, вторая доза через

1–4 месяца и, если необходимо, последующая (-ие) доза (-ы) через несколько месяцев.

К примерам приемлемых схем лечения относятся: (i) 0, 1 месяц и 6 месяцев, (ii) 0, 7
10 дней и 1 месяц, (iii) 0 и 1 месяц, (iv) 0 и 6 месяцев, или другие схемы, индуцирующие получение желаемых ответов, благодаря которым предположительно уменьшатся симптомы или тяжесть заболевания.

[00113] Антитела настоящей заявки могут быть лиофилизированы для хранения и перед применением восстановлены в приемлемом носителе. Было показано, что этот
15 способ эффективен для антител и других белковых препаратов, при этом могут быть применены известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

[00114] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиция, используемая для лечения таупатии, можно использовать в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения связанных нейродегенеративных
20 заболеваний. В случае БА антитела настоящей заявки можно вводить в комбинации с агентами, которые уменьшают или предотвращают отложение бета-амилоида (Abeta).

Возможно, патологии PNF-тау и Abeta являются синергетическими. Таким образом, комбинированная терапия, нацеленная на удаление патологий PNF-тау и Abeta одновременно, и патологий, связанных с Abeta, в то же время может быть более
25 эффективной, чем нацеливание на каждую из них по отдельности. В случае болезни Паркинсона и родственных нейродегенеративных заболеваний иммунная модуляция для удаления агрегированных форм белка альфа-синуклеина также представляет собой новую терапию. Комбинированная терапия, которая нацелена на удаление белков тау-белка и альфа-синуклеина одновременно, может быть более эффективной, чем
30 нацеливание на каждый белок по отдельности.

[00115] В другом общем аспекте заявка относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящей заявки, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с

фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Диагностические методы и наборы

[00116] Моноклональные антитела к РНФ-тау настоящей заявки можно применять в способах диагностики БА или иных таупатий у субъекта.

[00117] Таким образом, в другом общем аспекте заявка относится к способам обнаружения наличия РНФ-тау у субъекта и способам диагностирования таупатий у субъекта посредством обнаружения наличия РНФ-тау у субъекта с применением моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента настоящей заявки.

[00118] Фосфорилированный тау-белок может быть определен во взятой у субъекта биологической пробе (например, пробе крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости) путем приведения биологической пробы в контакт с диагностическим реагентом на основе антител и обнаружения связывания диагностического реагента на основе антител с фосфорилированным тау-белком во взятой у субъекта пробе. Анализ для проведения такого обнаружения включает в себя хорошо известные способы, такие как твердофазный ИФА, иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или визуализацию *in vivo*.

[00119] Диагностические антитела или аналогичные реагенты могут быть введены путем внутривенной инъекции в тело пациента или напрямую в головной мозг соответствующим путем, который обеспечивает доставку агента в организм-хозяина. Дозировки антител должны находиться в тех же диапазонах, как и для способов лечения. Как правило, антитела метят, хотя в некоторых способах первичное антитело с аффинностью к фосфорилированному тау-белку остается немеченым, но применяют вторичный метящий агент для связывания с первичным антителом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка пригодна для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток пригодно для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки могут быть также определены с применением ПЭТ или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

[00120] Диагностирование выполняют путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых РНФ-тау, агрегатов тау-белка и/или нейрофибриллярных клубков во взятой у субъекта пробе или у субъекта с соответствующими базовыми значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в

популяции здоровых людей. Исходные значения могут также представлять собой предшествующие уровни значений, определенные у того же субъекта.

[00121] Описанные выше диагностические способы можно также применять для контроля ответа субъекта на лечение путем обнаружения присутствия

5 фосфорилированного тау у субъекта до, в ходе или после лечения. Уменьшение значений по сравнению с базовыми значениями указывает на положительный ответ на лечение. В биологических жидкостях значения могут также временно возрастать при выводе патологического тау-белка из мозга.

[00122] Настоящая заявка дополнительно относится к созданию набора для

10 выполнения описанных выше способов диагностики и контроля. Как правило, такие наборы содержат диагностический реагент, такой как антитела настоящей заявки, и необязательно детектируемую метку. Диагностическое антитело может само содержать детектируемую метку (например, флуоресцентную молекулу, биотин и т. д.), которая определяется напрямую или с помощью вторичной реакции (например, реакции со стрептавидином). В альтернативном варианте осуществления можно использовать

15 второй реагент, содержащий обнаруживаемую метку, причем второй реагент имеет специфичность связывания с первичным антителом. В диагностическом наборе, приемлемом для измерения уровня PHF-тау в биологической пробе, антитела набора могут поставляться предварительно связанными с твердой фазой, например с лунками

20 микротитрационного планшета.

[00123] Содержание всех указанных ссылок (в том числе ссылок на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и одновременно находящиеся на рассмотрении патентные заявки), упомянутых в настоящей заявке, явным образом полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

25

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00124] В заявке также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[00125] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное

30 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, имеющем аминокислотную последовательность или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка.

[00126] Вариант осуществления 1a представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем

5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка.

[00127] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 1a, в котором:

- 10 (a) эпитоп тау-белка содержит любой из фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;
- (b) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не
- 15 содержит ни одного из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;
- (c) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427 и фосфорилированного S433 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S435 и не содержит ни один из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433
- 20 и фосфорилированного S435; или
- (d) эпитоп тау-белка содержит фосфорилированный T427 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435.

[00128] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов

25 осуществления 1 или 2, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие
- 30 полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;
- (b) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

(с) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 27, 18 и 19 соответственно;

5 (d) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 35 соответственно; или

10 (е) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 43 соответственно.

[00129] Вариант осуществления 3а представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов

15 осуществления 1–3, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

20 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

(b) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

25 (с) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 27, 18 и 19 соответственно;

30 (d) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 17, 18 и 35 соответственно; или

(е) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, состоящие из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 17, 18 и 43 соответственно.

5 **[00130]** Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–3а, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

15 **[00131]** Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

20 **[00132]** Вариант осуществления 5а представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариabельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности любой из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

25 **[00133]** Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5а, содержащие:

- (а) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3;
- 30 (b) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;

- (с) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; или
- (е) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39.

10 **[00134]** Вариант осуществления 6а представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–6, содержащие:

- (а) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 13;
- (с) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 23;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 31; или
- (е) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 39.

30 **[00135]** Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–6а, содержащие:

- (а) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11;
- (b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21;

(с) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29;

(d) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37;

5 или

(е) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45.

[00136] Вариант осуществления 7а представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов

10 осуществления 1–7, содержащие:

(a) тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 11;

15 (b) тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 21;

(с) тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 29;

20 (d) тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 37; или

(е) тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 45.

[00137] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–7а, содержащие:

30 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; или
- (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11.

[00138] Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–7а, содержащие:

- (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; или
- (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21.

[00139] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9.

[00140] Вариант осуществления 11 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 10.

[00141] Вариант осуществления 12 представляет собой клетку-хозяина, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 10.

[00142] Вариант осуществления 13 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00143] Вариант осуществления 14 представляет собой способ блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 13.

[00144] Вариант осуществления 15 представляет собой способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 13.

[00145] Вариант осуществления 16 представляет собой способ снижения патологической агрегации тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 13.

5 **[00146]** Вариант осуществления 17 представляет собой способ по варианту осуществления 15 или 16, причем таупатия выбрана из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни
10 Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезни Галлервордена — Шпатца, миозита с тельцами
15 включения, болезни Крейтцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и
20 dementia pugilistica (деменции боксеров).

[00147] Вариант осуществления 17a представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 15–17, дополнительно включающий введение нуждающемуся в этом субъекту дополнительного агента для лечения таупатии.

[00148] Вариант осуществления 18 представляет собой способ получения
25 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–9, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение
30 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

[00149] Вариант осуществления 19 представляет собой способ обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным моноклональным антителом

или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1–9 и обнаружение связывания моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PHF-тау во взятой у субъекта пробе.

[00150] Вариант осуществления 20 представляет собой способ по варианту осуществления 19, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

[00151] Вариант осуществления 21 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00152] Вариант осуществления 22 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9 для применения при лечении таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

[00153] Вариант осуществления 23 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 13 для применения в лечении таупатии, такой как наследственная болезнь Альцгеймера, спорадическая болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром Дауна, синдром Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдром Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда — Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна — Пика типа C, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская болезнь двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническая травматическая энцефалопатия или *dementia pugilistica* (деменция боксеров), у нуждающегося в этом субъекта.

[00154] Вариант осуществления 24 представляет собой применение выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–9 для получения лекарственного средства для лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта.

5 **[00155]** Вариант осуществления 25 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9 для получения лекарственного средства для лечения таупатии, такой как наследственная болезнь Альцгеймера, спорадическая болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17 (FTDP-17),
 10 прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, синдром Пика, прогрессирующий субкортикальный глиоз, деменция с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, деменция, характеризующаяся появлением аргирофильных зерен, комплекс амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдром
 15 Дауна, синдром Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, синдром Галлервордена — Шпатца, миозит с тельцами включения, болезнь Крейтцфельда — Якоба, множественная системная атрофия, болезнь Ниманна — Пика типа С, церебральная амилоидная ангиопатия с прионными белками, подострый склерозирующий панэнцефалит, миотоническая дистрофия, негуамская болезнь двигательных нейронов
 20 с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитический паркинсонизм, хроническая травматическая энцефалопатия или dementia pugilistica (деменция боксеров), у нуждающегося в этом субъекта.

[00156] Вариант осуществления 26 представляет собой способ диагностирования таупатии у субъекта посредством обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у
 25 субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1–9 и обнаружение связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау-белком во взятой у субъекта пробе.

30

ПРИМЕРЫ

[00157] Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры настоящей заявки. Следует понимать, что следующие примеры не

ограничивают заявку, и что объем заявки определяется прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Получение антитела

- 5 **[00158]** Антитела к PHF-тау-белку (PT/53, PT/66, PT/69, PT/81) и агрегированные *in vitro* антитела к тау-белку (hTau/60) получали с использованием стандартной гибридомной технологии у мышей с нокаутом тау-белка (КО) (Kohler and Milstein *Nature* 256:495-7, 1975). Полученные гибридомы высевали в 96-луночные планшеты и через 10 дней проводили скрининг прямым ИФА на нанесенном в количестве 25
- 10 нг/лунку PHF-тау, как описано ниже. Положительные клетки проверяли на кросс-реактивность на нанесенном в количестве 10 нг/лунку контрольном тау-белке (SEQ ID NO: 51), экспрессированном в клетках *E. Coli* BL21 и очищенном термообработкой и осаждением сульфатом аммония. Было обнаружено, что PT/53, PT/66, PT/69, PT/81 и hTau60 связываются как с PHF-тау-белком, так и с контрольным тау-белком
- 15 (SEQ ID NO: 51). PT/66, PT/69 и hTau/60 имели приоритет для клонирования и гуманизации V-области.
- [00159]** Положительные клетки немедленно субклонировали, а положительные клоны замораживали в жидком азоте. Все гибридомы выращивали в модифицированной среде Игла по способу Дульбекко с добавкой 10% эмбриональной
- 20 телячьей сыворотки (Hyclone, Европа), добавки для слияния и клонирования гибридомы (2%) (Roche, г. Брюссель, Бельгия) 2% НТ (Sigma, США), 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин и пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (50 мг/мл).
- [00160]** Вариабельные области антитела клонировали из выбранных гибридомных клеток на каркас мышиногo IgG1/IgG2/κ и экспрессировали и очищали стандартными
- 25 способами. Вкратце, гибридомные клетки лизировали в буфере RLT (№ 79216 по каталогу Qiagen) и замораживали при -70 °С. Лизат оттаивали при 37 °С и выделяли РНК с применением набора RNeasy 96 Kit (№ 74182 по каталогу Qiagen).
- [00161]** Аликвоту РНК применяли для синтеза кДНК, применяя смесь праймеров для ген-специфичной обратной транскрипции с применением праймеров,
- 30 сконструированных для отжига к константной области тяжелой цепи IgG мыши, легкой цепи каппа мыши или легкой цепи лямбда мыши.
- [00162]** Аликвоту кДНК применяли в реакциях ПЦР с наборами мышинных праймеров, выполненных с возможностью амплификации вариабельных областей тяжелой цепи IgG, вариабельных областей легкой цепи каппа или вариабельных

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

[00163] Продукты ПЦР для тяжелой цепи и легкой цепи каппа секвенировали (методом Сэнгера), применяя обратный праймер для тяжелой цепи или легкой цепи каппа, выполненный с возможностью отжига к соответствующей константной области. Полученные последовательности анализировали и совмещали для выявления зародышевой линии мыши с наилучшим соответствием. Первые десять аминокислот в последовательности каркасной области 1 для тяжелой цепи и легкой цепи каппа заменяли с применением соответствующей им последовательности зародышевой линии. Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи IgG и легкой цепи каппа оптимизировали по кодонам и синтезировали. Оптимизированные по кодонам вариабельные области тяжелой цепи IgG и легкой цепи каппа синтезировали и клонировали полученные фрагменты в экспрессионные векторы для тяжелой цепи изотипа IgG2a и изотипа легкой цепи каппа мыши.

[00164] Вариабельные области антитела клонировали из выбранных гибридомных клеток, секвенировали с применением стандартных способов и субклонировали в экспрессионные векторы для mAb и Fab. Mab получали на каркасе мышиного IgG2a/κ и экспрессировали и очищали аффинной хроматографией (белок A). Fab получали как химерные варианты с мышинными вариабельными областями, слитыми с константными доменами IgG1/κ человека и с гистидиновой меткой на C-конце тяжелой цепи. Fab временно экспрессировали в клетках НЕК293F и очищали аффинной хроматографией (HisTrap).

Пример 2. Описание свойств антитела

ИФА и вестерн-блоттинг

[00165] Анализ связывания с рекомбинантным тау-белком дикого типа (2N4R) провели методом ИФА. Полноразмерный тау-белок (в концентрации 1 нг/мл или 10 нг/мл) наносили непосредственно на планшет и инкубировали в присутствии различных концентраций антител РТ/66, РТ/69 или hTau/60, полученных рекомбинантным или гибридомным путем (Фиг. 1). В соответствии с ожиданиями, при более низких концентрациях нанесенного тау-белка получали более низкие

максимальные значения. Значимых различий между профилями связывания антител, полученных рекомбинантным или гибридным способом, не наблюдали.

[00166] Дальнейшее исследование профиля антител провели путем оценки связывания с тау-белком в образцах головного мозга разных биологических видов (мышь, собака, обезьяна и человек). В отношении тау-белка человека было проведено различие между растворимым тау-белком (термостабильный экстракт головного мозга человека без БА) и агрегированным PHF-тау-белком (нерастворимый в саркозиле препарат, полученный из головного мозга человека с БА). Чтобы иметь возможность обнаружить взаимодействия с более низким сродством к белкам, не родственным тау-белку, антитела тестировали в концентрации 1 мкг/мл и в гель загружали относительно большие количества гомогенатов головного мозга (20 мкг общего белка). Обзор полученных профилей представлен на Фиг. 2.

Количественная оценка связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

[00167] Оценку взаимодействий с PHF-тау-белком и рекомбинантным тау-белком провели с использованием метода ППР на приборе ProteOn (Bio-Rad, г. Геркулес, шт. Калифорния) для антител PT66, PT69, hTau60 к тау-белку и их соответствующих Fab-фрагментов. На аффинность mAb в данном формате исследования влияла авидность в связи с мультимерной/агрегированной природой PHF-тау-белка с множеством копий эпитопа и двухвалентной природой IgG. Информацию о присущей антителу аффинности получают на основании аффинности Fab-фрагмента. Репрезентативные сенсограммы связывания mAb и их Fab-фрагментов с PHF-тау-белком показаны на Фиг. 3, а краткое описание представлено ниже в таблице 1. В качестве эталона использовали HT7.

Таблица 1. Аффинность связывания hTau60, PT66, PT69 и их Fab-фрагментов с PHF и рекомбинантным тау-белком, определенная методом ППР

Название антитела	PHF-тау-белок		Рек. тау-белок
	K _D mAb (пМ)*	K _D Fab (пМ)	K _D Fab (пМ)
HT7 (эталонное mAb)	291	н/п	н/п
hTau60 (PT1B469)	69	427	26
PT66 (PT1B545)	56	514	40
PT69 (PT1B548)	102	437	69

* Полученные аффинности следует рассматривать как кажущиеся аффинности в связи с двухвалентной природой IgG и мультимерной/агрегированной природой PHF-тау-белка
н/п = неприменимо

Рек. = рекомбинантный

5

Профилирование антител с использованием ИНС

[00168] Иммуногистохимический анализ проводили на криосрезах головного мозга больного БА и субъекта без БА для подтверждения реактивности с физиологическим и патофизиологическим тау-белками *in situ*. PT66, PT69/PT87 и hTau60 показали активное связывание как с растворимым (в образцах головного мозга субъектов с/без БА), так и с агрегированным тау-белком (в образцах головного мозга субъектов с БА) (Фиг. 4). Дополнительный иммуногистохимический анализ провели с использованием образцов ткани, фиксированной в формалине и залитой парафином, взятых из головного мозга мышей дикого типа, мышей с нокаутом тау-белка (КО) и P301S (5 месяцев). Специфичность данных антител подтвердили на основании отсутствия сигнала в срезах головного мозга мышей с нокаутом тау-белка. Неагрегированный тау-белок обнаружили в срезах головного мозга мышей дикого типа и P301S, тогда как агрегированный тау-белок в стволе головного мозга мышей P301S также окрашивался PT/66, PT/69 и hTau/60 (Фиг. 5).

20

Пример 3. Функциональное тестирование в клеточных анализах

[00169] Способность PT/66, PT/69 и hTau/60 подавлять агрегирование тау-белка исследовали с помощью анализа иммунодеплеции, в котором используют НЕК-клетки, экспрессирующие два меченных хромофором фрагмента K18-тау-белка, которые генерируют сигнал путем агрегации, когда находятся в непосредственной близости. При обработке клеток агрегатами агрегированных и фосфорилированных полноразмерных тау-белков, полученными из разных источников, индуцируется агрегат K18, который можно количественно определить подсчетом клеток, положительных по резонансному переносу энергии флуоресценции (FRET), с использованием активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Holmes et al., 2014, PNAS. 111(41): E4376-85). Биохимический анализ иммунодеплетированных проб проводили методом самосэндвич-анализа MSD hTau60/hTau60.

30

[00170] Чтобы определить, связана ли максимальная процентная величина ингибирования с плотностью эпитопов на поверхности агрегатов или с числом

агрегатов, содержащих эпитоп для РТ/66, РТ/69 и hTau/60, провели анализы методом иммунодеплеции. Агрегаты тау-белка при БА инкубировали в присутствии тестового антитела и удаляли из раствора гранулами белка G. Супернатант после деплеции проверяли на остаточную способность к образованию агрегатов в НЕК-клетках, содержащих хромофор-K18, и анализировали методом FACS как описано ранее (Holmes et al., *PNAS*. 111(41): E4376-85, 2014).

[00171] Гомогенаты для иммунодеплеции, содержащие агрегаты тау-белка, получали из спинного мозга трансгенных животных Р301S в возрасте 22–23 недели или из криоконсервированных тканей головного мозга человека с БА. В анализе иммунодеплеции с применением тканей мозга человека с БА супернатант после деплеции проверяли в присутствии трансфекционного реагента Липофектамин 2000 для получения приемлемого аналитического окна. Агрегирование тау-белка (и сигнал агрегирования hTau60/hTau60) можно полностью убрать с использованием С-концевых антител, но не N-концевого антитела РТ93 (которое было описано в статье Vandermeeren et al., *J Alzheimers Dis*, 2018; 65(1): 265-281, соответствующее содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), в общих гомогенатах головного мозга человека с БА и в гомогенатах спинного мозга трансгенных мышей Р301S (ингибирование > 95%; ФИГ. 6А–Б и таблица 2, где показаны процентные значения ингибирования по сравнению с отрицательным контролем в виде среднего значения, полученного по результатам по меньшей мере 2 независимых экспериментов).

Таблица 2. Иммунодеплеции в клеточных анализах

Антитело	Конц. (нМ)	Иммунодеплеция биосенсорных клеток FRET_пул БА	Иммунодеплеция биосенсорных клеток FRET_Р301S, спинной мозг
РТ66	3	38,6 ± 4,8	46,5 ± 4,5
	300	98,6 ± 0,6	99,7 ± 0,2
РТ69	3	40,3 ± 4,2	45,8 ± 24,1
	300	97,9 ± 1,6	99,8 ± 0,1
hTau60	3	17,7 ± 6,7	22 ± 13,7
	300	97,2 ± 1,1	99,7 ± 0,05
РТ26	3	47,6 ± 5,9	79,1 ± 2,1
	300	80,4 ± 2,1	99,5 ± 0,2

[00172] В отдельном эксперименте было показано, что при последовательном анализе иммунодеплеции после первоначальной иммунодеплеции N-концевым антителом РТ93 С-концевое антитело hTau60 дополнительно истощало все остальные

агрегаты PHF, при этом отсутствовало или наблюдалось некоторое дополнительное истощение при использовании PT93 или PT51 (HT7-подобное антитело) (которое описано в статье Vandermeeren et al., *J Alzheimers Dis*, 2018; 65(1): 265-281, соответствующее содержание которой включено в настоящий документ посредством

5 ссылки), соответственно (Фиг. 6B).

[00173] Механизм действия терапии антителами к тау-белку по-прежнему является предметом обсуждения, и было предложено множество механизмов. Опосредованное антителом удаление внеклеточных агрегатов микроглиальными клетками недавно было предложено в качестве одного доминантного механизма действия (Funk et al., *J Biol*

10 *Chem.* 290(35):21652-62, 2015 и McEwan et al., 2017, PNAS 114:574-9). В данном контексте иммунодеплецию агрегированного материала, полученного из головного мозга человека, можно рассматривать как наиболее трансляционный клеточный результат, и на основании высокой эффективности С-концевых антител PT66, PT68/PT87 и hTau60 в этом типе клеточного анализа можно предположить, что HFA-

15 версии данных антител будут эффективными терапевтическими средствами.

Пример 4. Эффективность PT/66, PT/69 и hTau/60 *in vivo* в модели инъекции ePHF

Введение

[00174] Для оценки эффективности тау-белка *in vivo* принципиальными модельными системами являются мыши с патологией тау-белка головного мозга (Julen et al.,

20 *Methods Mol Biol.* 849:473-91, 2012). Некоторые из данных моделей были описаны, и они по существу могут быть разделены на три группы: 1) тау-трансгенные мыши, сверхэкспрессирующие тау-белок дикого типа или мутантный тау-белок (например, P301L или P301S), где у мутантов проявляется тяжелая патология в возрасте 5–

25 9 месяцев в зависимости от линии (Allen et al., *J Neurosci.* 22(21):9340-51, 2002; Scattoni et al., *Behav Brain Res.* 208(1):250-7, 2010; Terwel et al., *J Biol Chem.* 280(5):3963-73, 2005; Yoshiyama et al., *Neuron.* 53(3): 337-51, 2007), мыши с пространственно-временной регуляцией экспрессии мутантного тау-белка (например, P301L) (Liu et al., *Brain Imaging Behav.* 6(4): 610-20, 2012) или проагрегирующего фрагмента (например,

30 K18) (Mocanu et al., *J Neurosci.* 28(3):737-48, 2008); и 3) мыши с экспрессией как мутантного тау-белка, так и APP, для которого характерны как бляшки, так и патологии тау-белка (Oddo et al., *J Neurochem.* 102(4):1053-63, 2007).

[00175] Хотя у мышей, экспрессирующих мутантный тау-белок, развивается сильная патология, начало данной патологии может варьироваться у разных животных, что

приводит к вариабельности исследований, и относительный вклад клеточно-автономного агрегирования тау-белка и его роль в формировании общего сигнала агрегирования тау-белка остается не ясным. Поэтому для эффективного изучения агрегирования и распространения тау-белка можно использовать модели (например, de Caligon et al., 2012, *Neuron*. 73(4):685-97, 2012; Liu et al., *Id.*). Такие модели приобретают дополнительное трансляционное значение, поскольку инъекция мышам ALZ17 (линия, экспрессирующая нормальный тау-белок человека) гомогенатов головного мозга, полученных у субъектов с различными таупатиями, приводит к образованию включений тау-белка, морфология которых напоминает морфологию включений, формирующихся при таупатии в головном мозге человека. Например, инъекция мышам материала из проб, полученных у пациентов с заболеванием, характеризующимся появлением аргирофильных зерен, приводила к образованию отложений со сфероидальной структурой или структурой в виде запятой, характерной для самого заболевания, а у мышей, которым вводили материал, полученный от пациентов с БА, наблюдали патологию тау-белка, подобную выявляемой при БА (Clavaguera et al., 2013, *PNAS* 110 (23): 9535-40).

[00176] Таким образом, была создана трансгенная модель инъекции мышам P301L, в которой вызывающий агрегирование фрагмент тау-белка, такой как синтетические фибриллы K18 (Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006) или агрегаты PFH-тау, полученные из тканей мозга человека с БА, вводят в область коры головного мозга или гиппокампа модели трансгенной мыши P301L в возрасте, когда автономное агрегирование клеток еще не началось. Модель инъекции призвана имитировать критический компонент внеклеточного зародышеобразования в распространении тау-белка. Введенные фибриллы K18 или агрегаты тау-белка индуцируют таупатию на участке инъекции и, в меньшей степени, в связанной контралатеральной области (Peeraer et al., *Neurobiol Dis*. 73:83-95, 2015). Модель позволяет проверять потенциал к подавлению зародышеобразования антител, таких как антитела к тау-белку настоящей заявки, при совместной инъекции полученными из тканей мозга человека с БА агрегатами PHF-тау или фибриллами K18 (Iba et al., 2015, *J Neurosci*. 33(3):1024-37, 2013; Iba et al., *Acta Neuropathol*. 130(3):349-62).

[00177] Кортикальная инъекция нерастворимой в саркозиле фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывает медленно прогрессирующее возрастание агрегирования тау-белка. В инъектированном полушарии первые измеримые сигналы появляются через 1 месяц после инъекции и прогрессируют далее через 3 месяца после

инъекции. Через пять месяцев после инъекции у некоторых животных начинается образование клубков, вызываемое мутацией P301L (Terwel et al., 2005, *Id.*). Уровень окрашивания AT8 возрастает в период от 1 до 3 месяцев (патент США № 10,766,953), поэтому эксперименты по эффективности антител анализируют через 2 месяца после совместной инъекции. Кроме того, гиппокампальная инъекция нерастворимой в саркозиле фракции полученной после вскрытия ткани пациента с БА вызывает дозозависимое прогрессирующее возрастание агрегирования тау-белка по результатам анализа на платформе MesoScale Discoveries (MSD) нерастворимых в саркозиле фракций из инъектированных полушарий.

10 *Лечение животных и интракраниальная инъекция*

[00178] Для инъекционных исследований применяли трансгенных мышей тау-P301L, у которых экспрессировалась самая длинная изоформа человеческого тау-белка с мутацией P301L (тау-4R/2N-P301L) (Terwel et al., 2005, *Id.*), для проведения хирургии в возрасте 3 месяцев. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколами, одобренными локальными комитетами по этике. Для стереотактической хирургии мыши получали одностороннюю (правое полушарие) инъекцию в гиппокамп (AP -2,0, ML +2,0 (через темя), DV 1,8 мм (через твердую оболочку)) 3 мкл (скорость 0,25 мкл/мин) нерастворимого в саркозиле препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (обогащенный парными спиральными филаментами, ePHF) при наличии или отсутствии моноклональных антител. Мышей умерщвляли для вскрытия (через 2 месяца после интракраниальной инъекции).

20 *Процедура экстракции*

[00179] Ткань из инъектированного полушария мыши взвешивали и гомогенизировали в 6 объемах гомогенизационного буфера (10 mM Трис HCl (pH 7,6); 0,8 mM NaCl; 10% мас./об. сахарозы; 1 mM ЭГТК; смесь для ингибирования фосфатазы PhosStop; не содержащие ЭДТК мини ингибиторы протеаз). Гомогенат центрифугировали при 28 000 g в течение 20 минут и добавляли 1% N-лаурилсаркозин после отбора аликвоты из полученного супернатанта (полный гомогенат). Через 90 минут (900 об/мин, 37 °C) растворы повторно центрифугировали при 184 000 x g в течение 1 часа. Супернатанты сохраняли как растворимую в саркозиле фракцию, а содержащий нерастворимый в саркозиле материал осадок ресуспендировали в гомогенизационном буфере.

30 *Биохимический анализ*

[00180] Наносимое антитело (AT8) разводили в PBS (1 мкг/мл) и разливали аликвоты в планшеты для анализа MSD (30 мкл на лунку) (L15XA, Mesoscale Discoveries), которые инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C. После промывки 5 x 200 мкл PBS / 0,5% Tween-20 планшеты блокировали 0,1% казеина в PBS и еще раз промывали 5 x 200 мкл PBS / 0,5% Tween-20. После добавления проб и стандартов (и те и другие растворенные в 0,1% казеина в PBS) планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C. Затем планшеты промывали 5 x 200 мкл PBS / 0,5% Tween-20, добавляли конъюгированные с меткой SULFO-TAG™ детекторные антитела (AT8) в 0,1% казеина в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на 600 об/мин. После последней промывки (5 x 200 мкл PBS / 0,5% Tween-20) добавляли 150 мкл 2 X буфера T и считывали планшеты на визуализаторе платформы MSD. Необработанные сигналы нормировали по стандартной кривой, содержащей 16 разбавлений нерастворимого в саркозиле препарата из полученной после вскрытия ткани пациента с БА (ePHF) и выражали в единицах условной концентрации (отн. ед.) ePHF. Проводили статистический анализ (дисперсионный анализ с пост-тестом Бонферрони) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты

[00181] В данной модели совместной инъекции провели оценку нескольких внутренних антител к тау-белку (см., например, публикацию патента США № 10,766,953 и Vandermeeren et al., *J. Alzheimers Dis.* 65(1):265-81 (2018)). Активность данных антител (рекомбинантно экспрессированных как IgG2a) в модели совместной инъекции в гиппокамп сравнивали в соответствии с таблицей 3 ниже. При совместной инъекции антител к тау-белку наблюдали ослабление индуцированного ePHF агрегирования тау-белка у мышей P301L (ФИГ. 7A). AT120 описано в статье Vandermeeren et al., *J Alzheimers Dis*, 2018; 65(1): 265-281, соответствующее содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки, и оно связывается с богатым пролином доменом (PRD) тау-белка. PT/76 описано в статье Vandermeeren et al., *J Alzheimers Dis*, 2018; 65(1): 265-281, соответствующее содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки, и оно плотно связывается с доменом, связывающим микротрубочки (MTBD), в тау-белке.

Таблица 3. Группы совместной инъекции ePHF

Группа	Эпитоп	пмоль ePHF	пмоль Ab	Кол-во
IgG	He тау-белок	0,6	4,5	15
AT120	PRD	0,6	4,5	15
hTau/60	C-конец	0,6	4,5	15
PT/69	C-конец	0,6	4,5	15
PT/53	C-конец	0,6	4,5	14
PT/76	MTBD	0,6	4,5	15

[00182] Данные приведены в таблице 4.

Таблица 4. Резюме результатов исследований совместных инъекций

Антитело	Эпитоп	% ингибирования по сравнению с контролем	P-значение*
AT120	промежуточный	82	< 0001
PT/76	MTBD	86	< 0001
PT/53	C-конец	73	< 0001
PT/69	C-конец	92	< 0001
hTau/60	C-конец	75	< 0001

- 5 * Однофакторный дисперсионный анализ с использованием коррекции Бонферрони для многократного тестирования.

[00183] В отдельных экспериментах активность C-концевых антител PT66 и PT81 в модели совместной инъекции в гиппокамп мыши сравнивали с активностью внутренних антител к тау-белку Janssen, которые связываются с N-концевой частью и
10 средней частью PHF-тау-белка. Антитела вводили совместно с ePHF-тау-белком (0,6 пмоль) в кору головного мозга. При совместной инъекции C-концевых антител наблюдали ослабление индуцированного ePHF агрегирования тау-белка у мышей P301L в значительно большей степени по сравнению с другими антителами (ФИГ. 7Б).

[00184] В исследовании последующего наблюдения эффективность PT66, hTau60 и
15 PT3 (см. US 10,633,435, содержание которого включено в настоящий документ путем ссылки) сравнивали при периферическом введении (20 мг/кг; 2 раза в неделю) каждого антитела после интракраниальной совместной инъекции антитела и PHF.

Периферийное введение начинали за 2 недели до интракраниальной инъекции PHF и продолжали в течение активной фазы эксперимента. В соответствии с результатами
20 первого исследования совместное введение каждого из PT66, hTau60 и PT3 привело к снижению индуцированного ePHF сигнала агрегирования и подавляло формирование агрегатов, вызванное ePHF (ФИГ. 7В).

Пример 5. Картирование эпитопов С-концевых антител

Материалы и способы

Синтез пептидных массивов

- 5 **[00185]** Для реконструкции эпитопов целевой молекулы синтезировали библиотеку пептидов (20-меров с перекрыванием по 18 аминокислотам), покрывающих последовательность тау 441. Для этого получили модифицированную аминогруппами полипропиленовую подложку путем прививки с применением композиции гидрофильного полимера собственной разработки с последующей реакцией с трет-
- 10 бутилоксикарбонил-гексаметилендиамином (ВосHMDA) с применением дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBt) и последующим отщеплением Вос-групп с помощью трифторуксусной кислоты (TFA). Для синтеза пептидов на модифицированной аминогруппами полипропиленовой подложке применяли стандартный Fmoc-пептидный синтез на специально
- 15 модифицированных для этого автоматизированных рабочих станциях дозирования жидкостей JANUS (Perkin Elmer). Синтез структурных имитаторов был осуществлен с использованием запатентованной технологии Pepscan Chemically Linked Peptides on Scaffolds (Химически связанные пептиды на каркасах, CLIPS). Технология CLIPS позволяет структурировать пептиды в одиночные петли, двойные петли, тройные
- 20 петли, листоподобные складки, спиралеподобные складки и их комбинации. Шаблоны CLIPS связываются с цистеиновыми остатками. Боковые цепи множества цистеинов в пептидах связываются с одним или двумя шаблонами CLIPS. Например, 0,5 mM раствора P2 CLIPS (2,6-бис(бромометил)пиридина) растворяют в бикарбонате аммония (20 mM, pH 7,8) / ацетонитриле (1 : 3 (об./об.)). Этот раствор добавляют на пептидные
- 25 массивы. Шаблон CLIPS связывается с боковыми цепями двух цистеинов, присутствующих в связанных на твердой фазе пептидах пептидных массивов (455-луночные планшеты с лунками по 3 мкл). Пептидные массивы осторожно встряхивали в растворе в течение от 30 до 60 минут, при этом они были полностью покрыты раствором. Затем пептидные массивы тщательно промывали в избытке H₂O и
- 30 разрушали ультразвуком в буфере, содержащем 1% SDS / 0,1% бета-меркаптоэтанола в PBS (pH 7,2) при температуре 70 °C в течение 30 минут, с последующей ультразвуковой обработкой в H₂O в течение еще 45 минут. Несущие пептиды массивы T3 CLIPS получали аналогичным образом, но теперь с тремя цистеинами.

ИФА-скрининг

[00186] Связывание антител (экспрессируемых рекомбинантным образом как IgG2a) с каждым из синтезированных пептидов проверяли методом ИФА на основе Periscan.

Пептидные массивы инкубировали с раствором первичных антител (в течение ночи при температуре 4 °C). После промывания пептидные массивы инкубировали с раствором соответствующего конъюгата антитела с пероксидазой в разбавлении 1 : 1000 (SBA; таблица 4) в течение одного часа при температуре 25 °C. После промывки добавляли субстрат пероксидазы, 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолин сульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3-процентного H₂O₂. Через час измеряли образовавшуюся окраску. Окраску определяли количественно с помощью ПЗС-камеры и системы обработки изображений.

Результаты

[00187] На основании полученных данных показали связывание пяти родственных антител — PT/66, PT/53, hTau60, PT/81 и PT/69 — с рядом пептидных последовательностей с 1-го до 441-го остатков (ФИГ. 8). Для удобства интерпретации показаны только первые 2 N-концевых пептида и ряд пептидов с последовательностями 411–441. Для данных антител не наблюдали связывания с другими тау-пептидами (т. е. другие местоположения на тау-белке). Данные картирования показаны ниже в таблице 5.

Таблица 5. Картирование эпитопов

Антитело	Эпитоп	SEQ ID NO:	Допустимое фосфорилирование	Недопустимое фосфорилирование
hTau60	⁴³¹ EVSASLAKQG ₄₄₀	52	S433, S435	S433 + S435
PT50/PT53	⁴²⁶ ATLADEVASLAK ₄₃₈	53	T427, S433	S435, T427 + S433 + S435
PT66	⁴²⁶ ATLADEVASL ₄₃₆	54	T427, S433, S435	T427 + S433 + S435
PT69/PT87	⁴²² SPQLATLADEVASLAK ₄₃₈	55	T427, S433	S435, T427 + S433 + S435
PT81	⁴²⁸ LADEVASL ₄₃₆	56	T427	S433, S435, T427 + S433 + S435

Пример 6. Процессинг эпитопов

[00188] Если не ограничиваться теориями, то улучшенная эффективность при использовании С-концевого антитела, такого как PT66, и более низкая эффективность N-концевых антител могут быть обусловлены масштабным процессингом эпитопов на N-конце PHF-тау-белка. Данное предположение основано на профиле, полученном

по результатам анализа пробы PHF из головного мозга человека с БА при скрининге, проведенном методом вестерн-блоттинга (Фиг. 9). В данном эксперименте загружали большое количество пробы на 1-луночный гель. После блоттинга отдельные полосы инкубировали с панелью антител к тау-белку, связывающих различные эпитопы.

- 5 Полосы дорожек 10, 21 и 24 инкубировали с С-концевыми mAb к тау-белку и наблюдали значительное окрашивание полос, соответствующих соединениям с более низкой молекулярной массой. Для сравнения, полосы дорожек 13, 18 и 20 инкубировали с N-концевыми mAb к тау-белку, где не наблюдали обширного окрашивания полос, соответствующих соединениям с более низкой молекулярной
- 10 массой. Дополнительная рационализация описана в статье Vandermeeren et al., 2018, *J Alzheimers Dis*, 2018; 65(1):265-281).

- [00189]** Хотя варианты осуществления изобретения описаны подробно и со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, рядовому специалисту в данной области
- 15 будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от сущности и объема изобретения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Эпитоп тау-белка (aa422–438)	SPQLATLADEVASLAK
2	VH hTau60	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKVFGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPDNGETTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAKGATFVYWGQGTLLTVSA
3	VL hTau60	DVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCISSQSLVHSTGTTFLHWFLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGFYFCSQSTYFPLTFGSGTKLEIK
4	HCDR1 hTau60	GYTFTDYMN
5	HCDR2 hTau60	DINPDNGETTYNQKFKG
6	HCDR3 hTau60	GATFVY
7	LCDR1 hTau60	ISSQSLVHSTGTTFLH
8	LCDR2 hTau60	KVSNRFS
9	LCDR3 hTau60	SQSTYFPLT
10	HC hTau60	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKVFGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPDNGETTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAKGATFVYWGQGTLLTVSAAKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWV VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPGK

11	LC hTau60	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCISSQSLVHSTGTTFLHWFLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGFYFCSQSTYFPLTFGSGTKLEIKRA DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT DQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
12	VH PT/66	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIHPG RGSTKSNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARRWGFYWGQG TTLTVSS
13	VL PT/66	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLM STRASGVSDRFSGSGSGTDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGAGTKLELK
14	HCDR1 PT/66	GYTFTSYWIT
15	HCDR2 PT/66	DIHPGRGSTKSNEKFKS
16	HCDR3 PT/66	RWGFY
17	LCDR1 PT/66	RSSKSLLYKDGKTYLN
18	LCDR2 PT/66	LMSTRAS
19	LCDR3 PT/66	QQLVDYPLT
20	HC PT/66	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIHPG RGSTKSNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARRWGFYWGQG TTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIPIER TISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIVVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK
21	LC PT/66	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLM STRASGVSDRFSGSGSGTDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGAGTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
22	VH PT/69	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPG SGRTKSNEKFKNKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRWGLDYWGQG TTLTVSS
23	VL PT/69	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSNKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLM STRASGVSDRFSGSGSGTDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGAGTKLELK
24	HCDR1 PT/69	GYTFTNYWIT
25	HCDR2 PT/69	DIYPGSGRTKSNEKFKN
26	HCDR3 PT/69	RWGLDY
27	LCDR1 PT/69	RSNKSLLYKDGKTYLN
18	LCDR2 PT/69	LMSTRAS
19	LCDR3 PT/69	QQLVDYPLT
28	HC PT/69	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPG SGRTKSNEKFKNKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRWGLDYWGQG TTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIPIER TISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIVVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK
29	LC PT/69	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSNKSLLYKDGKTYLNWFLQRPQGQSPQLLIYLM STRASGVSDRFSGSGSGTDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGAGTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
30	VH PT/53	EVKLMEGGGLVQPGASLRSLCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKAPEWLALIRNK ANGYTTKYAASVKGRFTISRDNSQNILYLQMNTLRAEDSATYYCVKAVWFAYW QGTLTVSA

31	VL PT/53	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLWNFLQRPQGSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSVSGSGTDFLTLEISRKAEDVGYYCLQLVEYPYTFGGGKLEIK
32	HCDR1 PT/53	GFTFTDYMS
33	HCDR2 PT/53	LIRNKANGYTTKYAASVKG
34	HCDR3 PT/53	AVWFAY
17	LCDR1 PT/53	RSSKSLLYKDGKTYLN
18	LCDR2 PT/53	LMSTRAS
35	LCDR3 PT/53	LQLVEYPYT
36	HC PT/53	EVKLMESSGGGLVQPGASLRSLCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKAPEWLALIRNKANGYTTKYAASVKGFRFTISRDNSQNILYLQMNTRLAEDSATYYCVKAVWFAYWGQGLTVVSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
37	LC PT/53	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLWNFLQRPQGSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSVSGSGTDFLTLEISRKAEDVGYYCLQLVEYPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
38	VH PT/81	QVQLQQPGAELVRPGASVILSCKASGYTFTNSWIHWVKQRPGRVLEWIGRIDPNSGGTRYNENFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCSRGVLHDYWGQGTTLTVSS
39	VL PT/81	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLWNFLQRPQGSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSVSGSGTDFLTLEISRKAEDVGYYCQQLVEYPYTFGGGKLEIK
40	HCDR1 PT/81	GYTFTNSWIH
41	HCDR2 PT/81	RIDPNSGGTRYNENFKS
42	HCDR3 PT/81	GVLHDY
17	LCDR1 PT/81	RSSKSLLYKDGKTYLN
18	LCDR2 PT/81	LMSTRAS
43	LCDR3 PT/81	QQLVEYPYT
44	HC PT/81	QVQLQQPGAELVRPGASVILSCKASGYTFTNSWIHWVKQRPGRVLEWIGRIDPNSGGTRYNENFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCSRGVLHDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
45	LC PT/81	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCRSSKSLLYKDGKTYLWNFLQRPQGSPQLLIYLMSTRASGVSDRFSVSGSGTDFLTLEISRKAEDVGYYCQQLVEYPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
46	Изоформа тау-белка 0N3R	MAEPRQEFVMEHDAGTYGLDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAAGLKAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGQANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTRPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQAPVPMPLKNNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTPRHLNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

47	Изоформа тау-белка 1N3R	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTE DGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGS DDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSG DRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVP MPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGG GQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHG AEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL
48	Изоформа тау-белка 2N3R	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTE DGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTEIPEGTTAEAGIG DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQ KGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT REP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKV QIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNIT HVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGA EIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSI DMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL
49	Изоформа тау-белка 0N4R	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGD TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT EP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQ IINKKL DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHK GGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTD HGA EIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL
50	Изоформа тау-белка 1N4R	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTE DGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTEIPEGTTAEAGIG DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQ KGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT REP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKV QIINKKL DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHK PGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKT DHGA EIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL
51	Изоформа тау-белка 2N4R	MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTE DGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA AQPHTEIPEGTTAEAGIG DTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQ KGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT REP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKV QIINKKL DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHK PGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKT DHGA EIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL

ССЫЛКИ

- Abhinandan and Martin, *Mol Immunol*. 45:3832-9, 2008
- Adams et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 2):213-21, 2010
- Allen et al., *J Neurosci*. 22(21):9340-51, 2002
- 5 Almagro, *Mol Recognit*. 17:132-43, 2004
- Asuni et al., *J Neurosci*. 27:9115-29, 2007
- Boutajangout et al., *J Neurochem*. 118:658-67, 2011
- Boutajangout et al., *J Neurosci*. 30:16559-66, 2010
- Brunden et al., *Nat Rev Drug Discov*. 8:783-93, 2009
- 10 Butner and Kirschner, *J Cell Biol*. 115(3):717-30, 1991
- Chai et al., *J Biol Chem*. 286:34457-67, 2011
- Chothia and Lesk, *J Mol Biol*. 196:901-17, 1987
- Clavaguera et al., *Nat Cell Biol*. 11:909-13, 2009
- Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(23):9535-40, 2013
- 15 Clavaguera et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(23):9535-40, 2013
- Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 50(Pt 5):760-3, 1994
- Collin et al., *Brain*. 137(Pt 10):2834-46, 2014
- de Calignon et al., *Neuron*. 73(4):685-97, 2012
- 20 Emsley and Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004
- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- Fishwild et al., *Nat Biotechnol*. 14:845-51, 1996
- Fransson et al., *J Mol Biol*. 398(2):214-31, 2010
- 25 Frost et al., *J Biol Chem*. 284:12845-52, 2009
- Funk et al., *J Biol Chem*. 290(35):21652-62, 2015
- Goedert et al., *Biochemical J*. 301(Pt3):871-877
- Hanger et al., *Trends Mol Med*. 15:112-9, 2009
- Hoffmann et al., *Biochemistry*. 36(26):8114-24, 1997
- 30 Holmes et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(41): E4376-85, 2014
- Iba et al., *Acta Neuropathol*. 130(3):349-62, 2015
- Iba et al., *J Neurosci*. 33(3):1024-37, 2013
- Julien et al., *Methods Mol Biol*. 849:473-91, 2012

- Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 2):125-32, 2010
- Knappik et al., *J Mol Biol*. 296:57-86, 2000
- Knight et al., *Platelets*. 15:409-18, 2004
- Kohler and Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975
- 5 Krebs et al., *J Immunol Methods*. 254:67-84, 2001
- Lee et al., *Cell Rep*. 16(6):1690-700, 2016
- Lefranc et al., *Dev Comp Immunol*. 27:55-77, 2003
- Leong et al., *Cytokine*. 16:106-19, 2001
- Li and Lee, *Biochemistry*. 45(51):15692-701, 2006
- 10 Liu et al., *Brain Imaging Behav*. 6(4):610-20, 2012
- Lonberg et al., *Nature*. 368:856-9, 1994
- Malia et al., *Proteins*. 84:427-434, 2016
- Martin and Thornton, *J Mol Biol*. 263(5):800-15, 1996
- Matsuo et al., *Neuron*. 13(4):989-1002, 1994
- 15 McCoy et al., *J Appl Crystallogr*. 40(Pt 4):658-674, 2007
- McEwan et al., 2017, *PNAS* 114(3):574-9
- Mendez et al., *Nat Genet*. 15:146-56, 1997
- Mercken et al., *Acta Neuropathol*. 84(3):265-72, 1992
- Mercken, Ph.D. Thesis: University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991
- 20 Mocanu et al., *J Neurosci*. 28(3):737-48, 2008
- Morris et al., *Nat Neurosci*. 18(8):1183-9, 2015
- Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011.
- Murshudov et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 53(Pt 3):240-55, 1997
- Oddo et al., *J Neurochem*. 102(4):1053-63, 2007
- 25 Otvos et al., *J Neurosci Res*. 39(6):669-73, 1994
- Padlan et al., *Mol. Immunol*. 28:489-98, 1991
- Peeraer et al., *Neurobiol Dis*. 73:83-95, 2015
- Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:10029-33, 1989
- Scattoni et al., *Behav Brain Res*. 208(1):250-7, 2010
- 30 Schroeder et al., *J Neuroimmune Pharmacol*. 11(1):9-25, 2016
- Seubert et al., *J Biol Chem*. 270(32):18917-22, 1995
- Shi et al., *J Mol Biol*. 397:385-96, 2010
- Strohl, *Curr Opin Biotechnol*. 20:685-91, 2009
- Terwel et al., *J Biol Chem*. 280(5):3963-73, 2005

Wischik et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4884-8, 1988

Wu and Kabat, *J Exp Med*. 132:211-50, 1970

Yang et al., *Protein Eng*. 16:761-70, 2003

Yoshiyama et al., *Neuron*. 53(3):337-51, 2007

5 Zhao et al., *Protein Expr Purif*. 67(2):182-9, 2009

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тау-белком на эпитопе тау-белка, состоящем из
 - 5 аминокислотной последовательности или находящемся внутри аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают парные спиральные филаменты (PHF)-тау, предпочтительно PHF человеческого тау-белка.
- 10 2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором:
 - (a) эпитоп тау-белка содержит любой из фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;
 - 15 (b) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435 тау-белка, но не содержит ни одного из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435;
 - 20 (c) эпитоп тау-белка содержит один или более из фосфорилированного T427 и фосфорилированного S433 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S435 и не содержит ни один из фосфорилированного T427, фосфорилированного S433 и фосфорилированного S435; или
 - (d) эпитоп тау-белка содержит фосфорилированный T427 тау-белка, но не содержит фосфорилированного S433 или фосфорилированного S435.
- 25 3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, содержащие:
 - (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и
 - 30 участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;
 - (b) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

(с) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно;

5 и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 27, 18 и 19 соответственно;

(d) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно;

10 и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 35 соответственно; или

(е) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно;

и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 43 соответственно.

15

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–3, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

20

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, 12, 22, 30 или 38, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 31 или 39.

25

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–5, содержащие:

30

(а) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3;

- (b) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13;
- 5 (c) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23;
- (d) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 30, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31; или
- 10 (e) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39.
7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент
- 15 по любому из пп. 1–6, содержащие:
- (a) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11;
- (b) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21;
- 20 (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 29;
- (d) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37; или
- 25 (e) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 45.
8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:
- 30 (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

- (b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3; или
- (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (a) участки HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и участки LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи иммуноглобулина, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;
- (b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13; или
- (c) тяжелую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21.

10. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–9.

11. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 10.

12. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 10.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–9 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ блокирования агрегирования тау-белка у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 13.

15. Способ лечения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 13.

16. Способ снижения патологического агрегирования тау-белка или распространения таупатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 13.

5

17. Способ по п. 15 или 16, причем таупатию выбирают из группы, состоящей из наследственной болезни Альцгеймера, спорадической болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанной с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича, кортикобазальной дегенерации, болезни Пика, прогрессирующего субкортикального глиоза, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, деменции с аргирофильными зернами, комплекса амиотрофического бокового склероза-паркинсонизма-деменции, синдрома Дауна, болезни Герстманна — Штреусслера — Шейнкера, болезни Галлервордена — Шпатца, миозита с тельцами включения, болезни Крейтцфельда — Якоба, множественной системной атрофии, болезни Ниманна — Пика типа С, церебральной амилоидной ангиопатии с прионными белками, подострого склерозирующего панэнцефалита, миотонической дистрофии, негуамской болезни двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, постэнцефалитного паркинсонизма, хронической травматической энцефалопатии и dementia pugilistica (деменции боксеров).

10

15

20

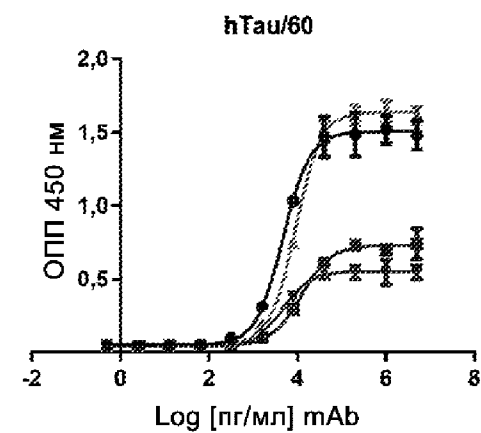
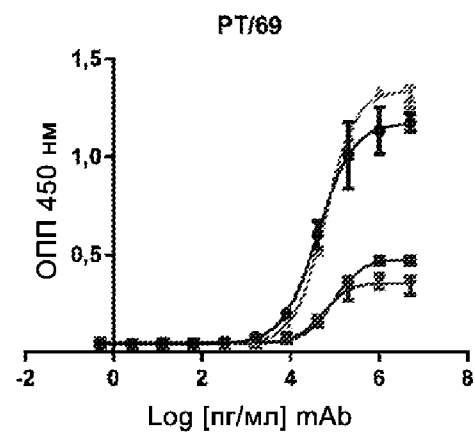
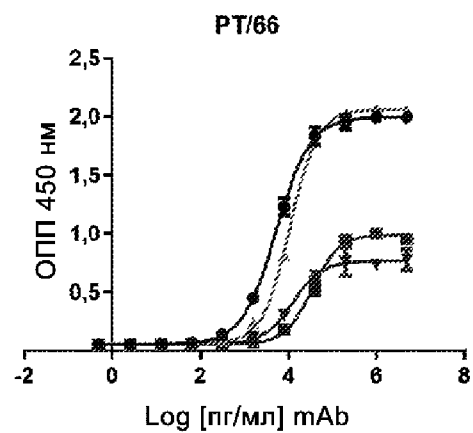
18. Способ получения выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–9, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры.

25

19. Способ обнаружения присутствия РНФ-тау во взятой у субъекта биологической пробе, включающий приведение биологической пробы в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1–9 и обнаружение связывания моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с РНФ-тау во взятой у субъекта пробе.

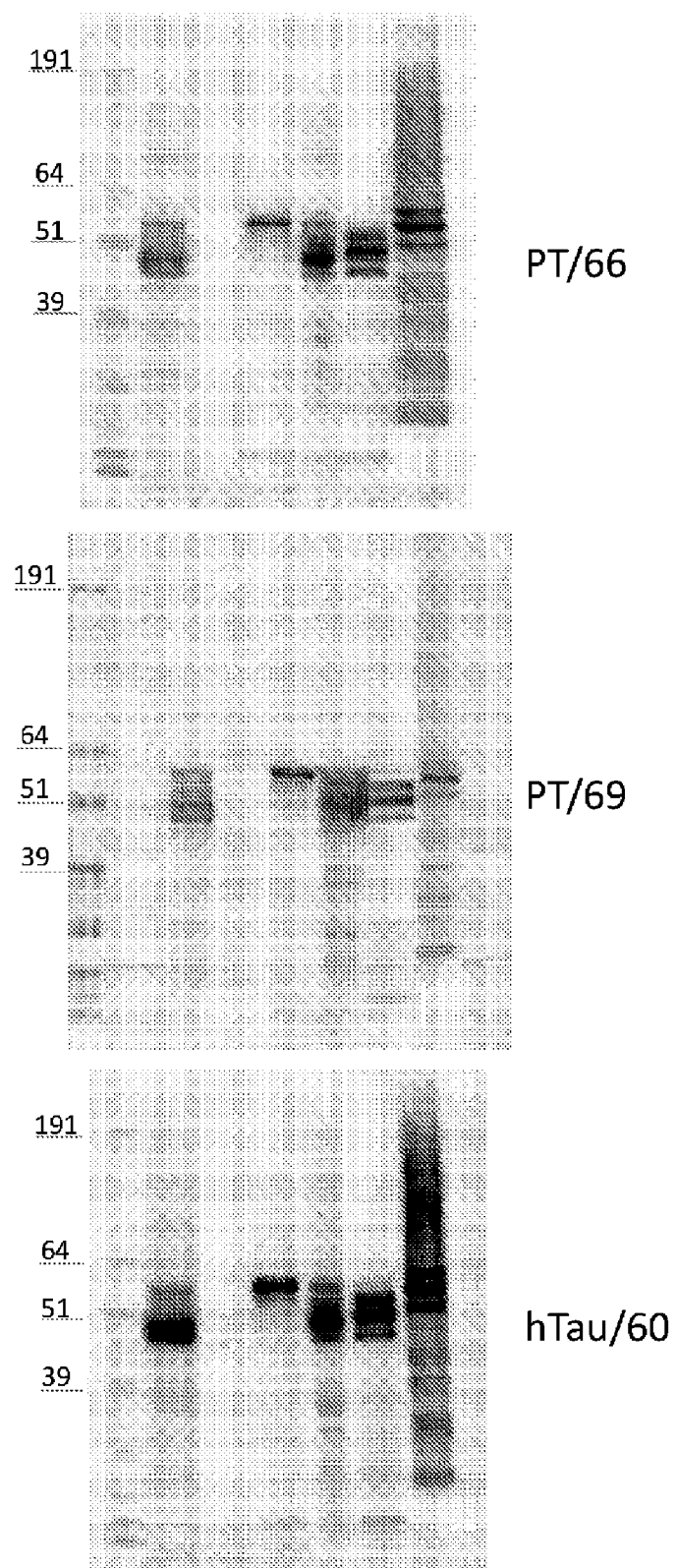
30

20. Способ по п. 19, в котором биологическая проба представляет собой пробу крови, сыворотки, плазмы, интерстициальной жидкости или спинномозговой жидкости.

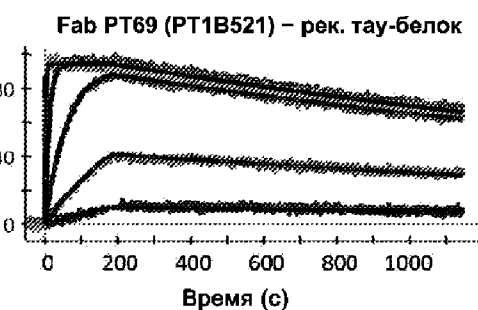
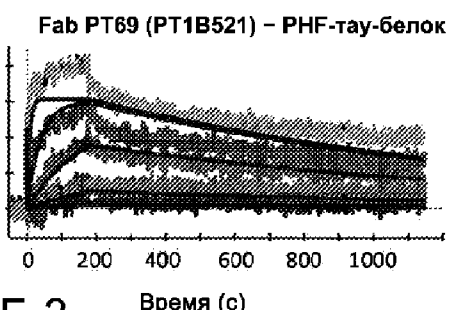
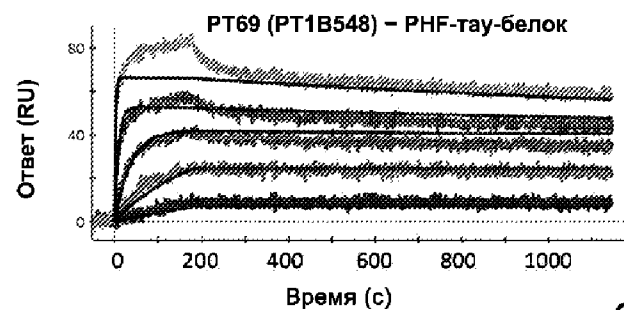
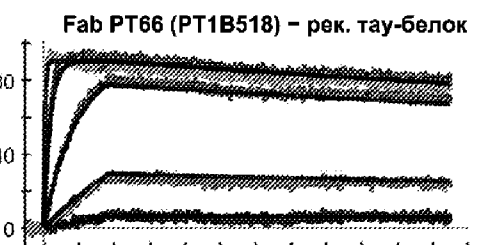
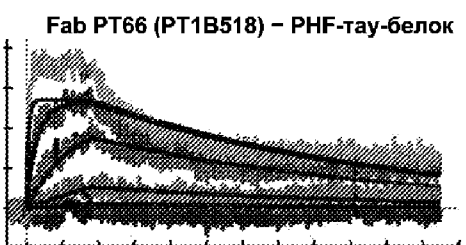
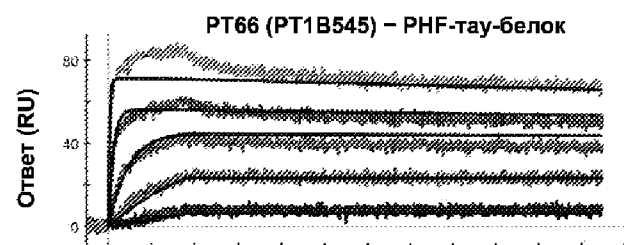
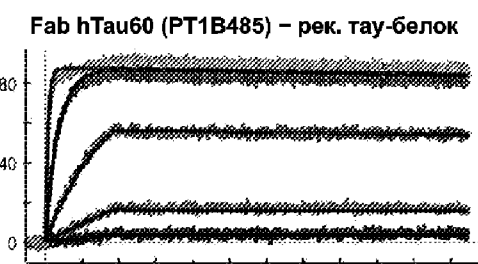
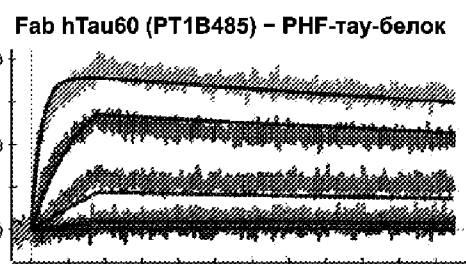
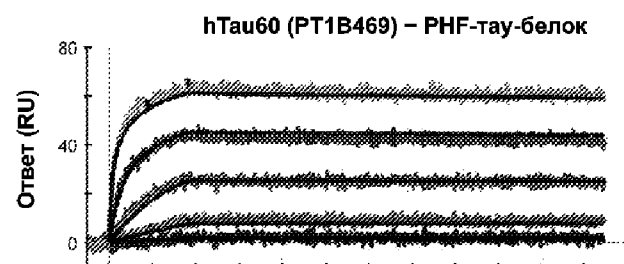
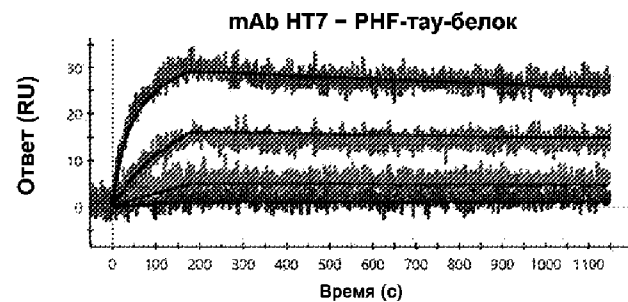


- гибридома (нанесено 10 нг/мл тау-белка)
- рекомбинант (нанесено 10 нг/мл)
- гибридома (нанесено 1 нг/мл тау-белка)
- рекомбинант (нанесено 1 нг/мл тау-белка)

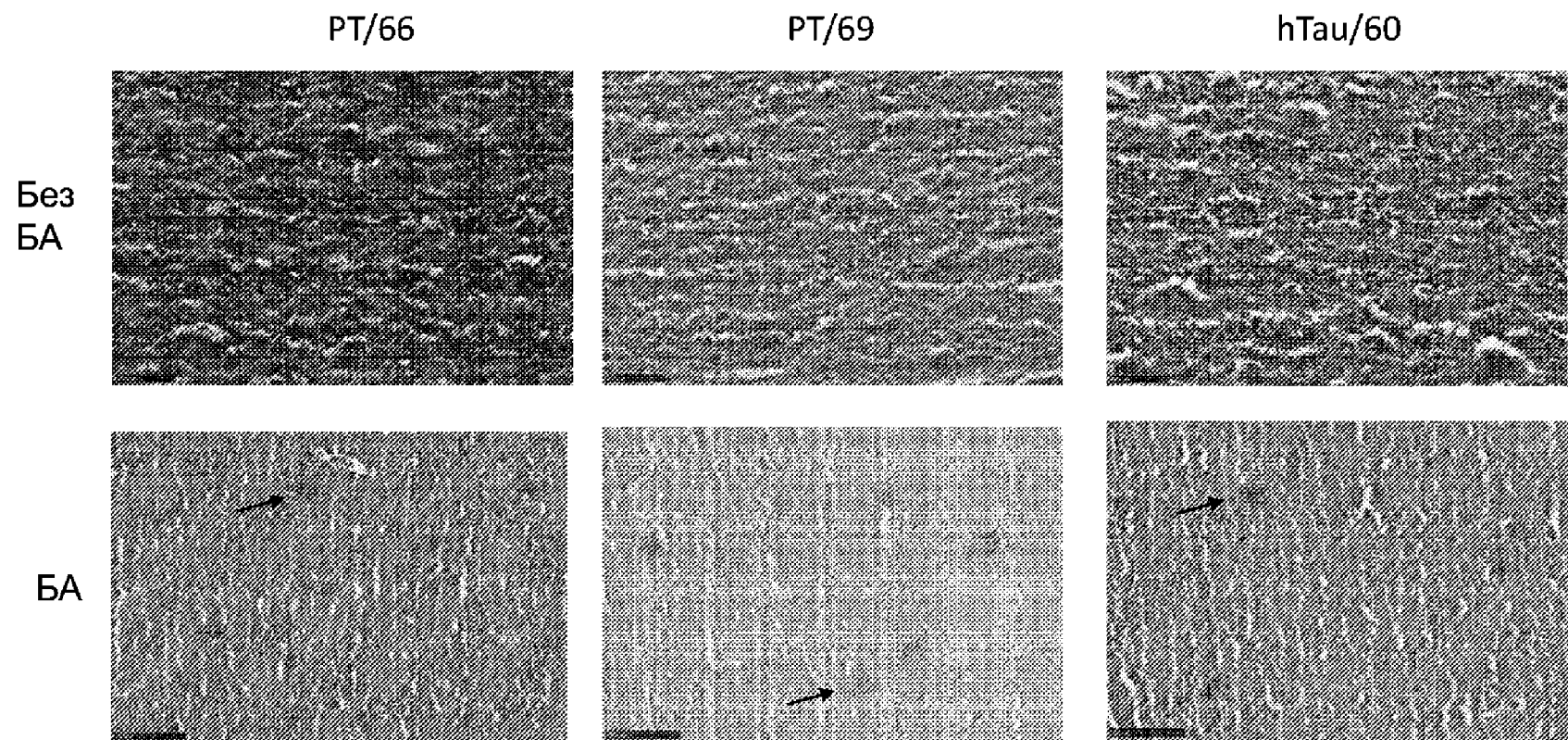
ФИГ. 1



ФИГ. 2

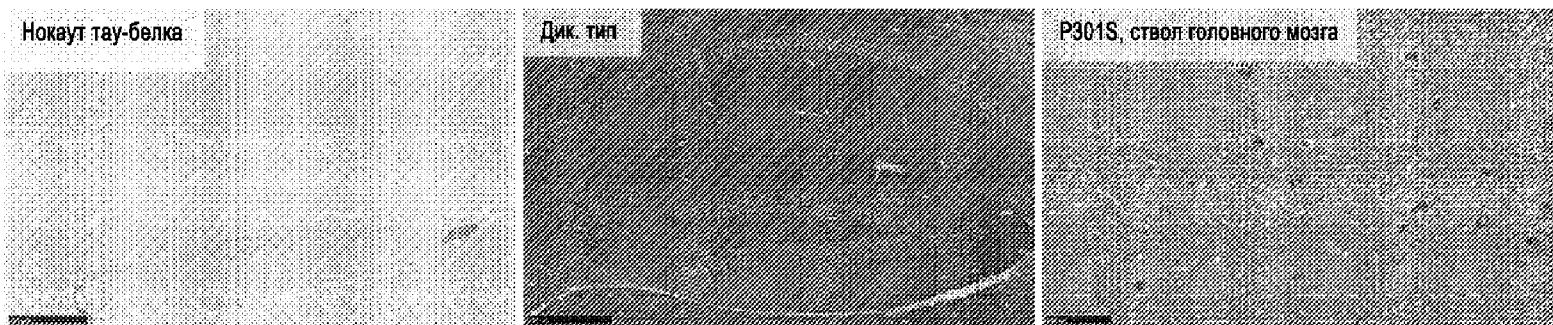


ФИГ. 3

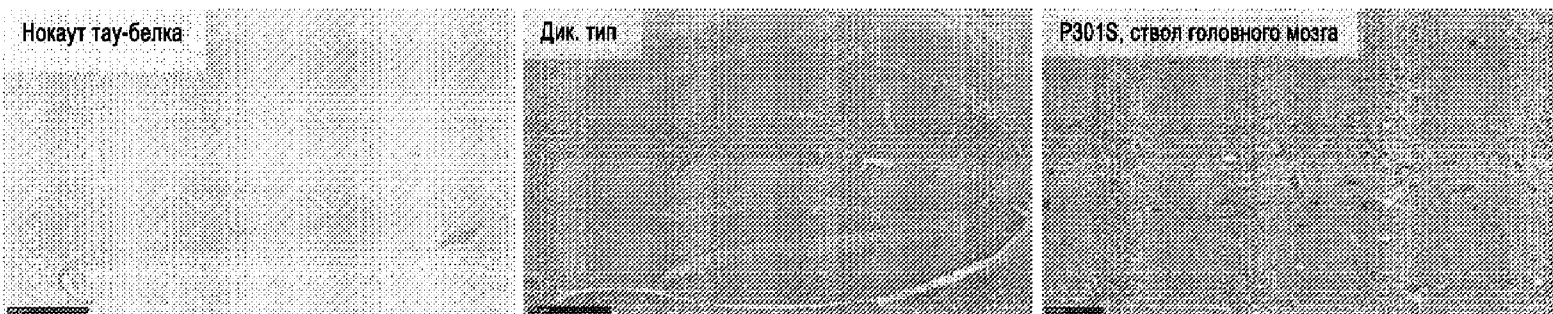


ФИГ. 4

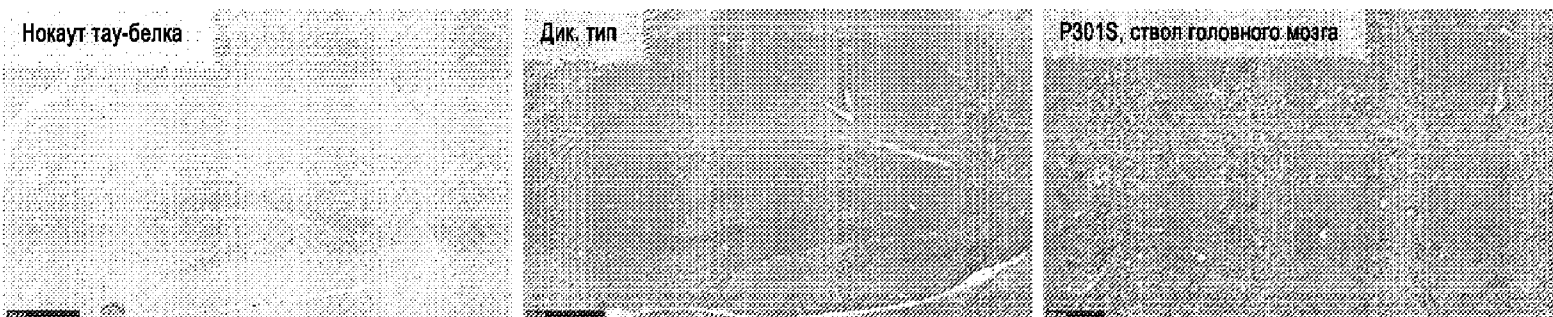
hTau/60



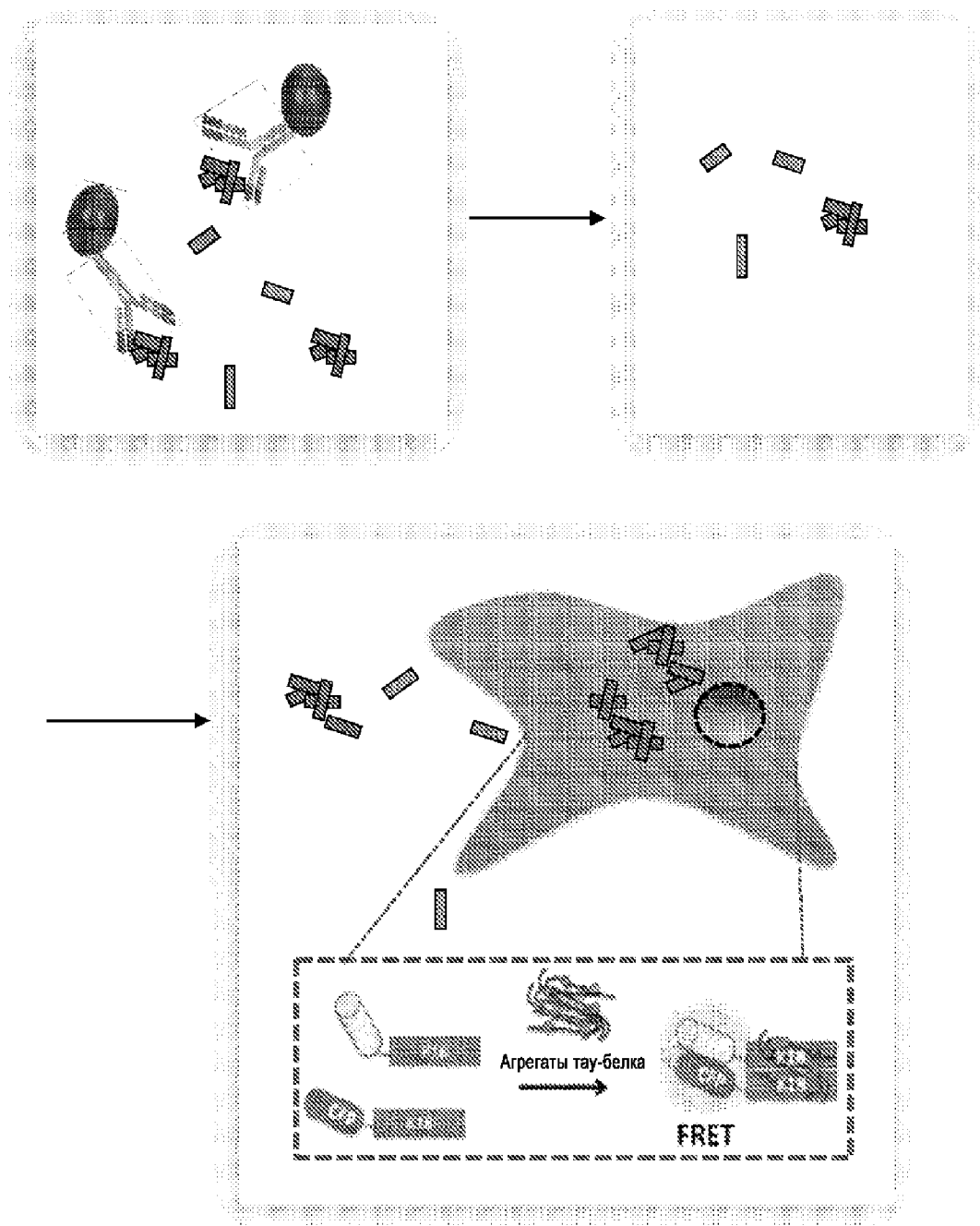
PT/69



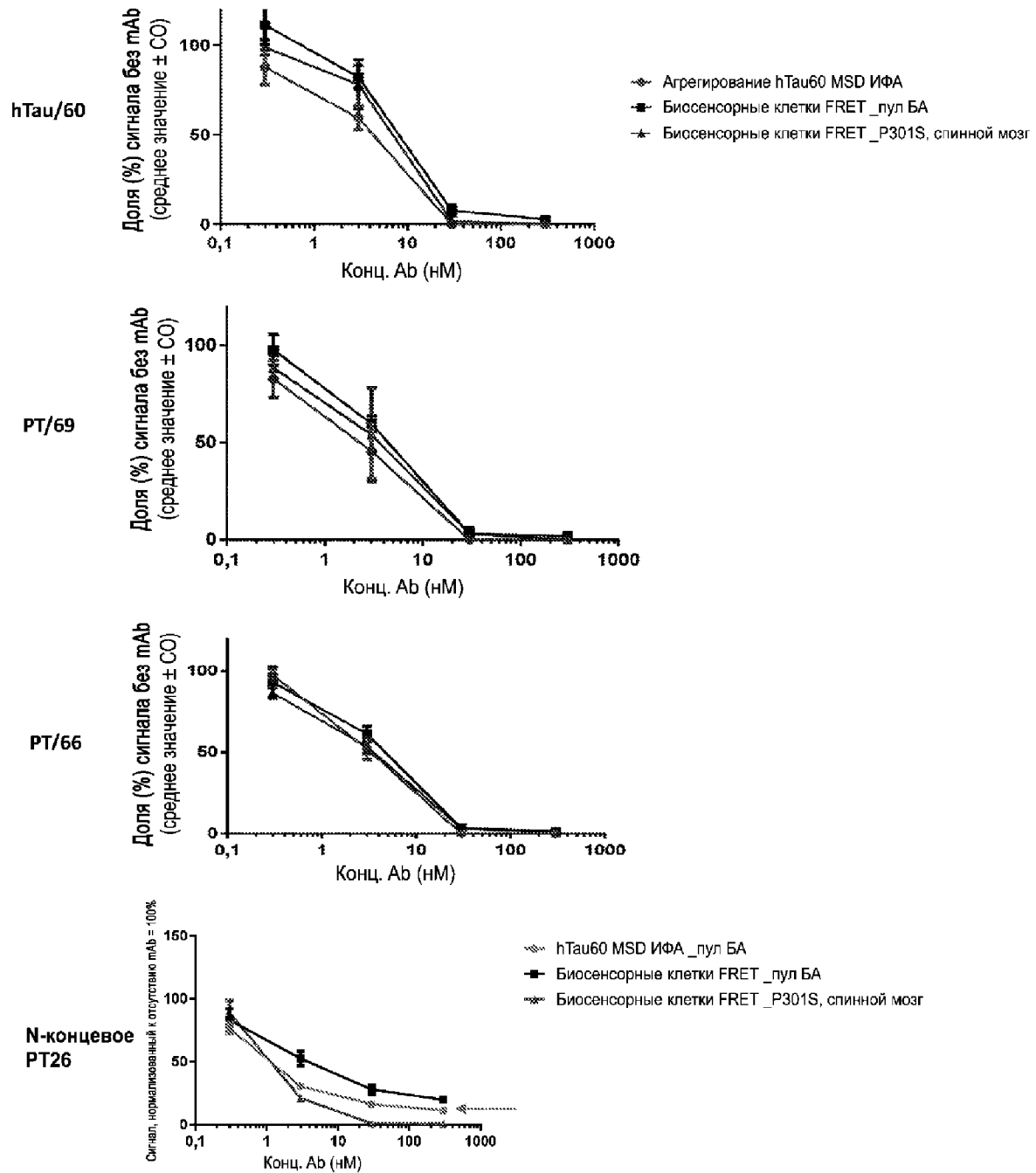
PT/66



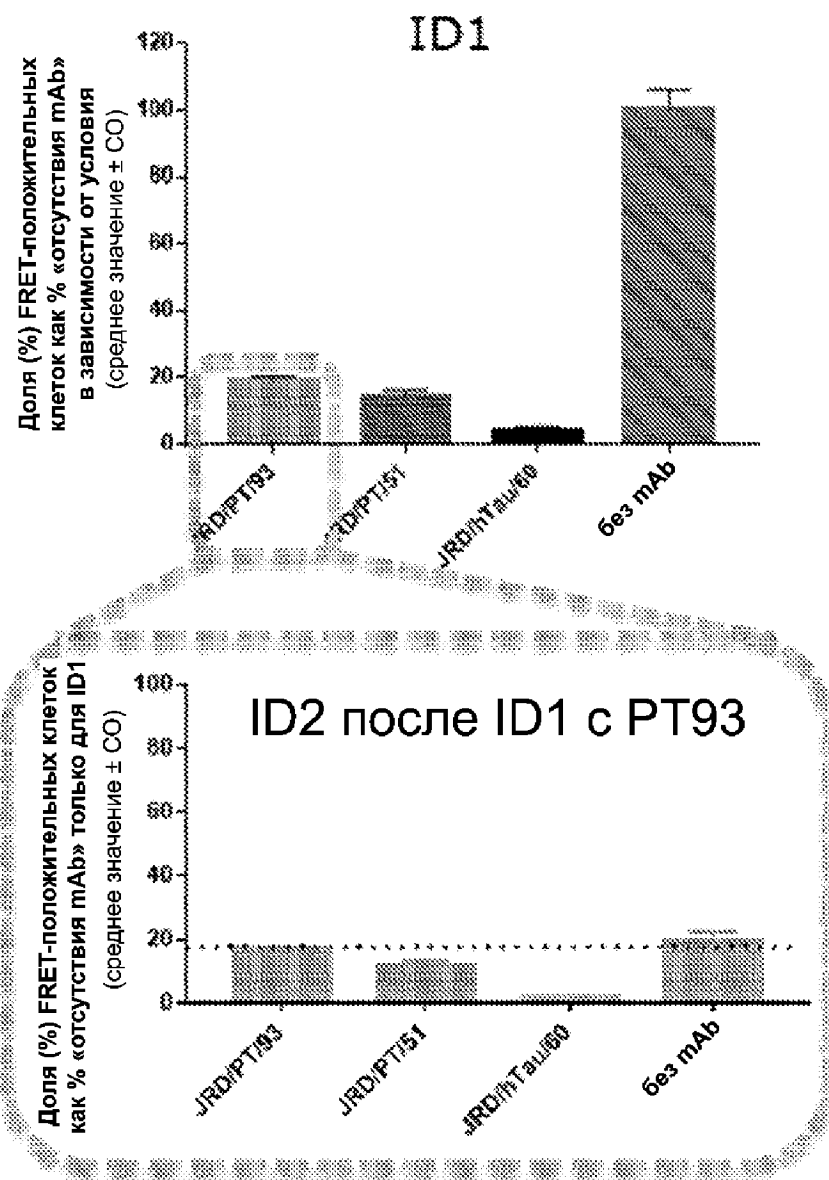
ФИГ. 5



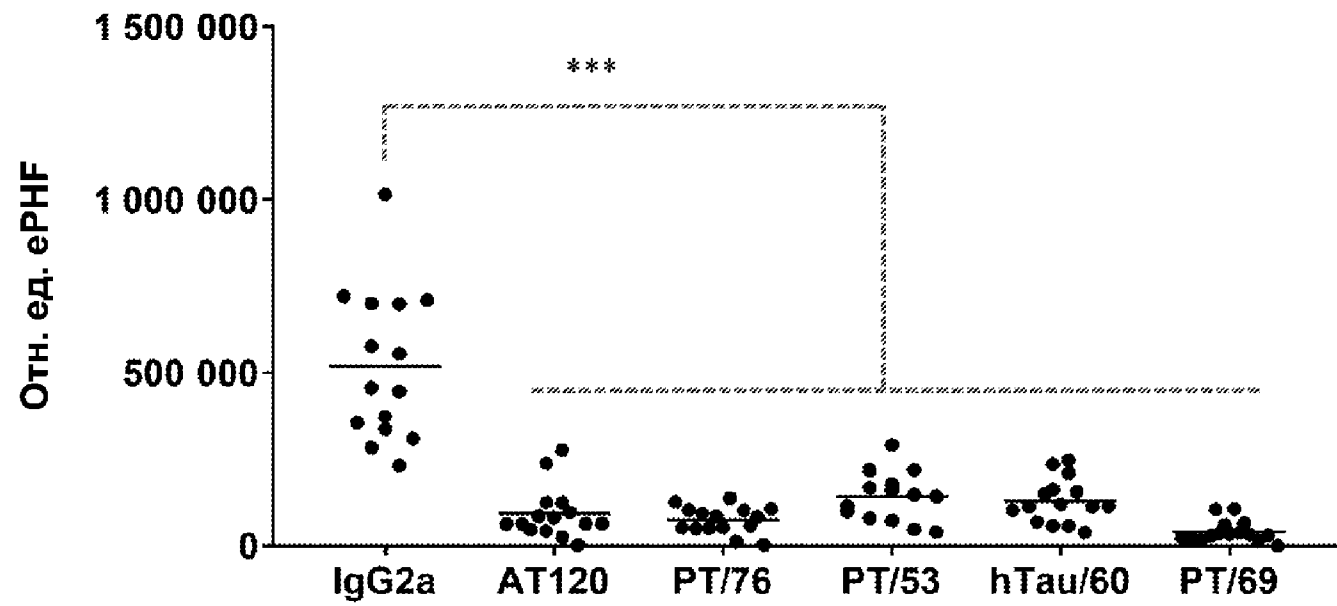
ФИГ. 6А



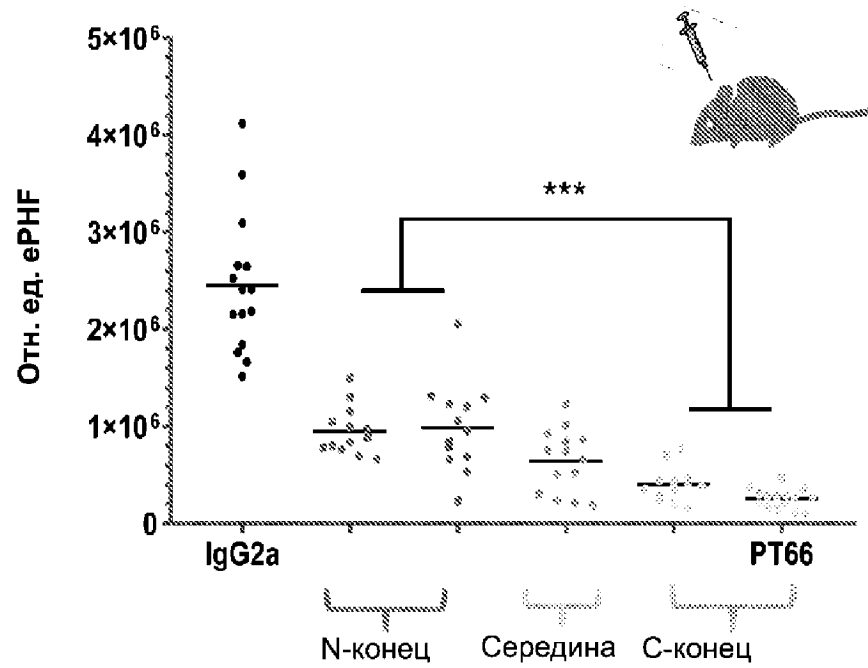
ФИГ. 6Б



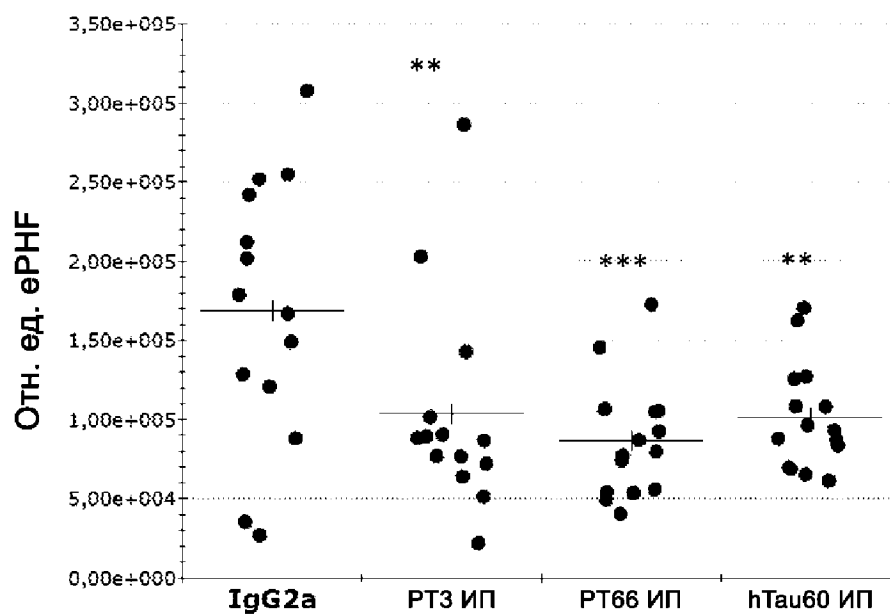
ФИГ. 6В



ФИГ. 7А



ФИГ. 7Б

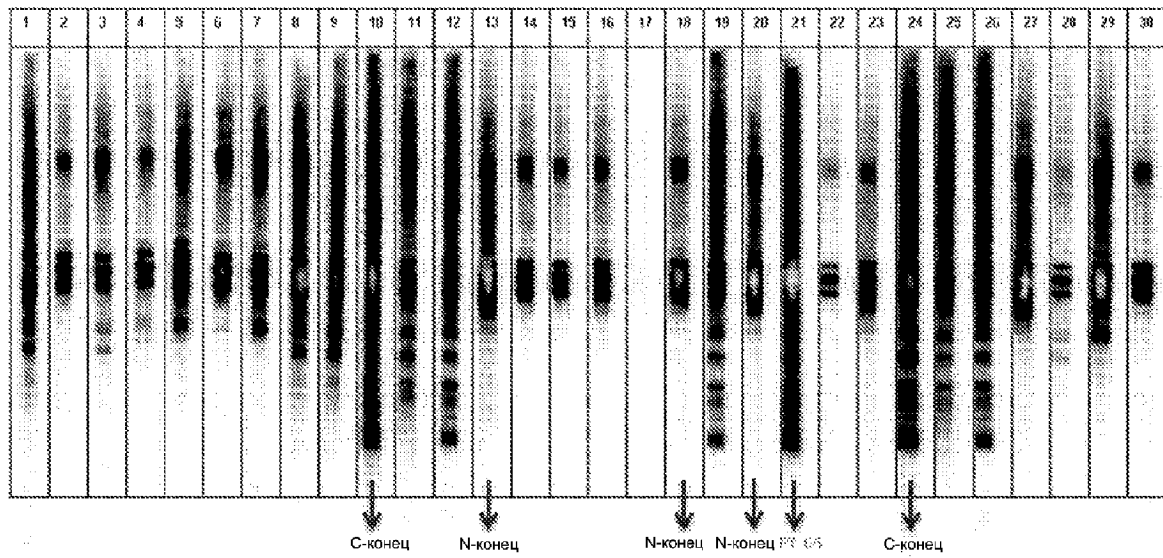


ФИГ. 7В

		PT/66	PT/53	hTau/60	PT/81	PT/69
Начало	Ограничитель					
1	20	40	38	48	43	30
3	22	45	44	44	45	38
411	430	50	29	36	31	43
413	432	2517	38	46	30	1377
415	434	2933	40	24	78	2829
417	436	2944	637	48	2795	2925
419	438	2926	2091	45	2896	2922
421	440	2930	2876	2910	2905	2933
429	441	2946	2926	2923	2918	2931

V S S T G S I D M V D S P Q L A T L A D
 S T G S I D M V D S P Q L A T L A D E V
 G S I D M V D S P Q L A T L A D E V S A
 I D M V D S P Q L A T L A D E V S A S L
 M V D S P Q L A T L A D E V S A S L A K
 D S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G
 S P Q L A T L A D E V S A S L A K Q G L

ФИГ. 8



ФИГ. 9