

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035943**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.03**

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

(21) Номер заявки  
**201591285**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.03.12**

### (54) АНТИТЕЛО, СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ТАУ-БЕЛКОМ ЧЕЛОВЕКА

(31) **61/780,624; 61/800,382**

(32) **2013.03.13; 2013.03.15**

(33) **US**

(43) **2016.02.29**

(86) **PCT/US2014/025044**

(87) **WO 2014/165271 2014.10.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСЕС  
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:  
**Сьюберт Питер, Долан III Филип  
Джеймс, Лью Юэ, Барбур Робин (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **US-B2-8012936**

VIGO-PELFREY, C. et al. Elevation Of Microtubule-Associated Protein Tau In The Cerebrospinal Fluid Of Patients With Alzheimer's Disease. April 1995, Vol. 45, No. 4; pages 788-793, abstract, page 789, left column, fourth paragraph

**US-A1-20120204275**

**US-A1-20120230911**

**US-A1-20090028851**

**US-A1-20120288507**

**US-A1-20100022026**

**US-A1-20120149880**

**US-A1-20120308480**

**US-A1-20100267927**

(57) В изобретении предложены гуманизированные, химерные и венированные антитела, которые связываются с тау-белком человека. Указанные антитела ингибируют или задерживают развитие тау-ассоциированных патологий и ассоциированного симптоматического ухудшения. Предложенные антитела можно применять в способе лечения или профилактики болезни Альцгеймера, способе лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с тау-белком, способе уменьшения аберрантного переноса тау-белка, способе индукции фагоцитоза тау-белка, способе ингибирования агрегации или отложения тау-белка и способе ингибирования образования клубков тау-белка, которые также входят в объем изобретения. Также предложены фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, которое ассоциировано с тау-белком, содержащая антитело согласно изобретению, нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи антитела согласно изобретению и антиген-связывающий фрагмент антитела согласно изобретению.

**B1****035943****035943****B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка представляет собой не являющуюся предварительной заявку, поданную на основе 61/780624, поданной 13 марта 2013 г., и 61/800382, поданной 15 марта 2013 г., каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей.

### Уровень техники

Тау представляет собой хорошо известный человеческий белок, который может существовать в фосфорилированных формах (см., например, Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992). Известно, что тау играет роль в стабилизации микротрубочек, в частности, в центральной нервной системе. Общий тау (t-тау, т.е. фосфорилированные и нефосфорилированные формы) и фосфо-тау (p-тау, т.е. фосфорилированный тау) высвобождаются мозгом в ответ на повреждение нейронов и нейродегенерацию, и, как сообщалось, уровень данных белков повышен в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов с болезнью Альцгеймера по сравнению с общей популяцией (Jack et al., Lancet Neurol 9: 119-28 (2010)).

Тау представляет собой основной компонент нейрофибриллярных клубков, которые наряду с бляшками являются отличительной особенностью болезни Альцгеймера. Клубки состоят из аномальных фибрилл размером 10 нм в диаметре, которые спарены в виде спирали с регулярной периодичностью 80 нм. Тау в нейрофибриллярных клубках аномально фосфорилирован (гиперфосфорилирован) фосфатными группами, присоединенными к специфическим сайтам в молекуле. Тяжелое поражение нейрофибриллярными клубками обнаруживается во II слое нейронов энторинальной области коры, CA1 и в области основания гиппокампа, миндалинах и более глубоких слоях (III, V слоях и поверхностном VI слое) неокортекса при болезни Альцгеймера. Гиперфосфорилированный тау, как сообщалось, также препятствует сборке микротрубочек, что может способствовать нарушению нейронной сети.

Включения тау отчасти обуславливают нейропатологию нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, лобно-височную лобарную дегенерацию, прогрессирующий надъядерный паралич и Болезнь Пика.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении среди прочего предложено антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. Некоторые антитела согласно настоящему изобретению представляют собой гуманизированные, химерные, венированные антитела или антитела человека. Некоторые антитела представляют собой изотип IgG человека (например, IgG1, IgG2, или IgG4). Подобные антитела имеют константную область IgG1 человека, имеющую последовательность SEQ ID NO: 29. Некоторые антитела имеют каппа-константную область человека, имеющую последовательность SEQ ID NO: 32. Некоторые антитела имеют по меньшей мере одну мутацию в константной области.

Некоторые из антител представляют собой гуманизированную, химерную или венированную форму моноклонального антитела 16B5. Некоторые антитела имеют три CDR легкой цепи, как определено по Кабату, и три CDR тяжелой цепи, как определено по Кабату, моноклонального антитела 16B5.

Некоторые антитела связываются с тау в фосфорилированной и нефосфорилированной форме.

В настоящем изобретении также предложены моноклональные антитела, содержащие зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99%) идентичную последовательности SEQ ID NO: 15, и зрелую переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99%) идентичную последовательности SEQ ID NO: 22. В определенных вариантах реализации моноклональное антитело содержит три CDR по Кабату последовательности SEQ ID NO: 15 и три CDR по Кабату последовательности SEQ ID NO: 22. В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 15, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 21, 22 или 23.

В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H13, H48 и H91 занята К, М и F, соответственно, и по меньшей мере одна из позиций L1, L4, L36 и L43 занята N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере две из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по меньшей мере три из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно. В некоторых антителах позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и позиции L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

В некоторых антителах зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи и зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природ-

ной константной области человека, которая имеет пониженное связывание с рецептором Fc $\gamma$  по сравнению с природной константной областью человека. В некоторых антителах константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

В некоторых антителах различия в CDR зрелой вариабельной области тяжелой цепи и зрелой вариабельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 15 и 22, соответственно, находятся в позициях H60-H65.

Антитела могут представлять собой интактные антитела или фрагменты, такие как Fab-фрагмент.

Любое из моноклональных антител или фрагментов может быть конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

В настоящем изобретении также предложены способы гуманизации антитела. Некоторые способы включают определение последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела мыши; синтезирование нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине с получением гуманизированного антитела, где антитело мыши представляет собой 16B5.

В настоящем изобретении также предложены способы получения гуманизированного, химерного или венированного антитела. Некоторые способы включают культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела таким образом, что клетка секретирует антитело; и очистку антитела от культуральной среды, где антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 16B5.

В настоящем изобретении также предложены способы получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело. Некоторые способы включают введение в клетки вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела и селективный маркер; размножение клеток в условиях для отбора клеток, имеющих увеличенное число копий вектора; выделение отдельных клеток из выбранных клеток и формирование банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основании выхода антител; где антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 16B5.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие любое антитело, описанное в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. Данные композиции могут применяться для лечения или профилактики заболевания, которое ассоциировано с тау-белком.

В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие сегмент, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 10. В настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие сегмент, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25. Некоторые нуклеиновые кислоты дополнительно содержат сегмент, кодирующий константную область IgG1, необязательно константную область IgG1 человека, например, имеющую последовательность SEQ ID NO: 29 при условии, что С-концевой лизин может быть опущен. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 30. Подобные нуклеиновые кислоты дополнительно содержат интрон, связывающий сегменты, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и константную область IgG1. Например, интрон может иметь последовательность интрона, найденного в SEQ ID NO: 31. Таким образом, интрон и сегмент, кодирующий константную область IgG1, могут иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31.

В настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 16.

В настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, содержащая сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 21, 22 или 23. В некоторых нуклеиновых кислотах сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, имеет последовательность SEQ ID NO: 26, 27 или 28. Подобные нуклеиновые кислоты дополнительно содержат сегмент, кодирующий каппа-константную область. Каппа-константная область может представлять собой каппа-константную область человека и может иметь последовательность SEQ ID NO: 32. Необязательно, нуклеиновая кислота, кодирующая каппа-константную область, имеет последовательность SEQ ID NO: 33. Некоторые указанные нуклеиновые кислоты дополнительно содержат интрон, связывающий сегмент, кодирующий вариабельную область легкой цепи, с сегментом, кодирующим каппа-константную область. Например, интрон может иметь последовательность интрона, найденного в SEQ ID NO: 34. Таким образом, интрон и сегмент, кодирующий каппа-константную область, может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34.

Любое из вышеупомянутых антител может включать тяжелую цепь, содержащую константную область IgG1 человека, имеющую последовательность SEQ ID NO: 29, и/или легкую цепь, содержащую каппа-константную область человека, имеющую последовательность SEQ ID NO: 32.

В настоящем изобретении также предложен выделенный фрагмент тау, содержащий 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты включают 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID NO: 1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты содержат остатки 33-37 последовательности SEQ ID NO: 1 (Swiss-Prot № P10636-8). Некоторые фрагменты связаны с молекулой-носителем, необязательно через спейсер, который способствует выработке антител к фрагменту. Некоторые фрагменты являются частью фармацевтической композиции, содержащей адъювант, приемлемый для введения людям.

В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском болезни Альцгеймера, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке, например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах пациент является носителем ApoE4.

В настоящем изобретении также предложены способы лечения или осуществления профилактики заболевания, ассоциированного с тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском заболевания, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (например, гуманизированное антитело 16B5), например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

В настоящем изобретении также предложены способы уменьшения аберрантного переноса тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с аберрантным переносом тау, и тем самым осуществляя лечение или профилактику заболевания. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (например, гуманизированное антитело 16B5), например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предложены способы индукции фагоцитоза тау. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с накоплением тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (например, гуманизированное антитело 16B5), например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования агрегации или отложения тау. В определенных вариантах реализации способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с агрегацией или отложением тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, опи-

санное в настоящей заявке (например, гуманизированное антитело 16B5), например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования образования тау клубков. Некоторые способы включают введение эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, пациенту, имеющему или с риском заболевания, ассоциированного с образованием клубков тау. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке (например, гуманизированное антитело 16B5), например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых способах агент, который индуцирует антитело, представляет собой фрагмент тау, который содержит 3-10 смежных остатков тау в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых способах заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

В настоящем изобретении также предложены способы скрининга агента в отношении активности против болезни Альцгеймера. Некоторые способы включают введение агента трансгенному животному, экспрессирующему трансгенный тау, и определение того, ингибирует ли агент или задерживает по меньшей мере один признак или симптом болезни Альцгеймера, где агент представляет собой антитело согласно настоящему изобретению, например гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты экспериментов по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие полноразмерный тау или делеционные мутанты тау ( $\Delta 5$ -24 или  $\Delta 25$ -44), окрашены при помощи антител 16B5 (левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение). Антитело Tau46 связывается с С-концевым эпитопом тау.

На фиг. 2 представлены результаты экспериментов по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие полноразмерный тау или делеционные мутанты тау, окрашены при помощи антител 16B5 (верхнее левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение). Больше воздействие на блот, окрашенный антителами 16B5, показано на нижнем левом изображении. Делеционные мутанты тау, проанализированные в данном эксперименте, включают  $\Delta 25$ -44,  $\Delta 5$ -24,  $\Delta 23$ -32,  $\Delta 30$ -39 и  $\Delta 37$ -46.

На фиг. 3 представлены результаты экспериментов аланинового сканирования по картированию эпитопа(ов), связывающихся с моноклональным антителом 16B5. Вестерн-блоты, содержащие дикий тип тау (WT) или аланиновые точечные мутанты тау, окрашены при помощи антител 16B5 (левое изображение) или антител Tau46 (правое изображение). Аланиновые мутанты тау, проанализированные в данном эксперименте, включают T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L и G42A.

На фиг. 4 показаны относительные количества белка тау, обнаруженные в нерастворимой в саркозие фракции ствола головного мозга трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 или антителом 6F10, неиммунным изотипом IgG1 в качестве контроля. Образцы анализировали при помощи вестерн-блоттинга, окрашивания антителами и количественной оценки результирующего сигнала. Антитела, применяемые для детектирования, включали специфические антитела к фосфо-тау (AT8, верхнее левое изображение; AT100, нижнее левое изображение, или 1F5, верхнее правое изображение) и пан тау антитела (HT7, нижнее правое изображение).

На фиг. 5 показано соотношение количества фосфо-тау и общего белка тау (левое изображение) и нормированное количество общего тау (правое изображение), обнаруженное в общих гомогенатах ствола головного мозга трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 или антителом 6F10, неиммунным изотипом IgG1 в качестве

контроля. Образцы анализировали при помощи вестерн-блоттинга, окрашивания антителами и количественной оценки результирующего сигнала. Антитела AT8 применяли для обнаружения фосфо-тау, и антитела HT7 применяли для обнаружения общего тау. Антитела к ГАФД применяли для нормализации количества тау, обнаруженного у мышей, обработанных посредством антител 16B5, по сравнению с контрольным антителом 6F10.

На фиг. 6 представлены срезы ядер мозжечка трансгенных мышей, которые экспрессируют белок tau.P301L человека, иммуногистохимически окрашенные с помощью антител AT8 к фосфо-тау. Мышей пассивно иммунизировали или антителом 16B5 (верхнее левое изображение) или антителом 6F10 (нижнее левое изображение), неиммунным изотипом IgG1 в качестве контроля. Оценка количества окрашенного тау, обнаруженного посредством антитела AT8 в промежуточном ядре мозжечка, передней и задней части, прилегающей к боковому ядру мозжечка (IntA/P/LAT) и субталамическом ядре, прилегающем к неопределенной зоне (STH/ZI) у мышей, пассивно иммунизированных антителами 16B5 или 6F10, показана на верхних столбчатых диаграммах. Оценка количества окрашенного фосфо-тау, обнаруженного с применением антитела AT100 к фосфо-тау на срезах IntA/P/LAT и STH/ZI, полученных от мышей, пассивно иммунизированных антителами 16B5 или 6F10, показана на нижних столбчатых диаграммах. Статистическую значимость оценивали при помощи t-теста Стьюдента,  $p < 0,05$ .

На фиг. 7 представлены результаты иммунопреципитации тау, полученные при помощи химерных антител 16B5 и гуманизированных антител 16B5 (версии H1L2 и H1L3). Иммунопреципитация тау происходила и в растворимых, и в нерастворимых фракциях посмертных образцов лобной коры, полученных от пациента с болезнью Альцгеймера. Присутствие тау в блоттированных иммунопреципитатах определяли при помощи поликлональных антител к тау (тау pAb).

### Определения

Моноклональные антитела и другие терапевтические агенты обычно представлены в выделенном виде. Это означает, что агент обычно по меньшей мере на 50% мас./мас. чистый от мешающих белков и загрязняющих веществ, образующихся при производстве или очистке, но это не исключает возможности того, что агент объединен с избытком фармацевтически приемлемого носителя(ей) или другими носителями, предназначенными для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела (или другие терапевтические агенты) по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 99% мас./мас. чистые от мешающих белков и загрязняющих веществ, образующихся при производстве или очистке.

Антитела согласно изобретению обычно связываются с предназначенной мишенью с константой ассоциации по меньшей мере  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Такое связывание является специфическим связыванием в том плане, что заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего с по меньшей мере одной посторонней мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным соответствием (например, по типу "ключа и замка"), тогда как неспецифическое связывание обычно происходит за счет силы Ван-дер-Ваальса. Специфическое связывание, однако, не обязательно означает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, которая несет основную ответственность за распознавание антигена. Данная вариабельная область первоначально экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевой участок каждой цепи определяет константную область, которая несет основную ответственность за эффекторную функцию. Константная область может включать в себя любые или все из области CH1, шарнирной области, области CH2 и области CH3.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены "J" областью примерно 12 или более аминокислот, тяжелые цепи также содержат "D" область примерно 10 или более аминокислот (см. в общем, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей).

Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифичных антител, два сайта связывания являются одинаковыми. Цепи в целом имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR от двух цепей каждой пары выровнены каркасными областями, обладающими способностью связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу и легкие и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Аминокислоты к каждому домену относят в соответ-

ствии с определениями по Кабату, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Кабат также предлагает широко применяемую систему нумерации (нумерация Кабата), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается тот же номер.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Обычно фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывания с мишенью. Фрагменты включают отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fv и однодоменные антитела. Однодоменные (вариабельные) антитела включают области VH, отделенные от своих партнеров VL (или наоборот) в обычных антителах (Ward et al., 1989, *Nature* 341: 544-546) так же, как и области VH (иногда называемые VHH) у таких видов, как Camelidae или хрящевых рыб (например, акула-нянька), у которых области VH не связаны с областями VL (см., например, WO 9404678). Однодоменные антитела, в которых одна цепь отделена от ее природных партнеров, иногда называют Dab, и однодоменные антитела от Camelidae или хрящевых рыб иногда называют нанотела. Константные области или части константных областей могут присутствовать или могут не присутствовать в однодоменных антителах. Например, природные вариабельные области однодоменного антитела от Camelidae включают вариабельную область VHH и константные области CH2 и CH3. Однодоменные антитела можно подвергать гуманизации аналогичными подходами как для обычных антител. Антитела типа Dab, как правило, получают из антител человеческого происхождения. Антитела типа нанотел являются Camelidae или акулье происхождения и могут подвергаться гуманизации. Фрагменты моно получить при помощи технологии рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает в себя биспецифические антитела. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелых/легких цепей и два различных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)).

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть сформирован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые расположены рядом благодаря третичной укладке одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря третичной укладке, обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 и чаще всего по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Когда эпитоп указан в пределах диапазона аминокислотных остатков в белке (например, в пределах от 25 до 44 остатков тау), диапазон включает остатки, определяющие его границы. Определенные остатки в пределах диапазона участвуют в образовании эпитопа, тогда как другие могут не участвовать. Остатки, которые образуют эпитоп, могут быть или могут не быть смежными друг с другом. Аналогичным образом, когда антитело связывается с эпитопом, находящимся в пределах конкретного диапазона аминокислот, антитело не обязательно должно связываться со всеми остатками аминокислот в пределах диапазона, и остатки эпитопа, которые контактируют с антителом, могут быть или могут не быть смежными друг с другом. Методы 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, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать при простом иммуноанализе, показывающем способность одного антитела конкурировать с другим антителом за связывание с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела также можно определить при помощи рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с антигеном, чтобы идентифицировать контактирующие остатки. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Изобретение включает антитела, которые конкурируют с 16B5 и/или которые связываются с тем же эпитопом на тау, как и 16B5.

Конкуренцию между антителами определяют при помощи анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела (например, 16B5) к общему антигену (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно 75, 90 или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, определенные в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антитела, и антитела, связывающиеся с прилегающим эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связывающимся с эталонным антителом, чтобы происходили стерические помехи.

Термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

Для классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): цистеин, серин, треонин; группа III (кислые боковые цепи): аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; группа IV (основные боковые цепи): аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): глицин, пролин; и группа VI (ароматические боковые цепи): триптофан, тирозин, фенилаланин. Консервативные замены включают замены между аминокислотами в том же классе. Неконсервативные замены представляют собой замену члена одного из этих классов на другой член.

Процент идентичности последовательностей определяется с последовательностями антител, максимально выровненными по системе нумерации Кабата. После выравнивания, если область исследуемого антитела (например, вся зрелая переменная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с такой же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательности между областями исследуемого и эталонного антитела представляет собой количество позиций, занимаемых одинаковыми аминокислотами, в обеих областях исследуемого и эталонного антитела, разделенное на общее число выровненных позиций двух областей, без учета пробелов, умноженное на 100, для преобразования в проценты.

Термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с антигеном усиливает и/или перенаправляет иммунный ответ на антиген, но при введении отдельно не генерирует иммунный ответ на антиген. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ по нескольким механизмам, включая рекрутинг лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов.

Заболевание ассоциировано с тау, если совокупность пациентов с заболеванием имеет повышенный уровень тау в мозге, или повышенные отложения или включения тау, или наличие клубков тау в мозге, или повышенное фосфорилирование тау в мозге (среднее количество фосфатных групп в молекуле тау), или аномальную межклеточную или внутриклеточную передачу тау по сравнению с совокупностью субъектов, для которой не известно наличие неврологического заболевания. Заболевание также ассоциировано с тау, если пациенты с вариантной формой гена тау имеют повышенный риск развития заболевания по сравнению с пациентами с диким типом (наиболее часто встречающийся вариант в популяции человека) гена тау.

Индивид находится в группе повышенного риска заболевания, если субъект имеет по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез, ситуационное воздействие), помещая лиц с данными фактором риска в статистически значимый больший риск развития заболевания, чем лиц без факторов риска.

Термин "симптом" относится к субъективному свидетельству о заболевании, например к измененной походке, по ощущениям пациента. "Признак" относится к объективному свидетельству о заболевании, наблюдаемым врачом.

Статистическая значимость  $p \leq 0,05$ .

### **Подробное описание изобретения**

#### **I. Общее.**

В изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 23-46 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела связываются с тау независимо от состояния фосфорилирования. Некоторые антитела согласно изобретению служат для ингибирования или задержки тау-ассоциированных патологий и связанного с ними симптоматического ухудшения. Хотя понимание механизма не требуется для практической реализации изобретения, снижение токсичности может происходить в результате индукции антителами фагоцитоза тау, ингибирования меж- или внутримолекулярной агрегации тау или от связывания с другими молекулами, путем стабилизации нетоксичной конформации, или путем ингибирования межклеточного или внутриклеточного переноса патогенных форм тау среди прочих механизмов. Антитела согласно изобретению или агенты, которые индуцируют такие антитела, можно применять в способах лечения или осуществления профилактики болезни Альцгеймера и других заболеваний, ассоциированных с тау.

#### **II. Тау.**

Если иное не очевидно из контекста, указание на тау означает природную форму тау человека, включая все изоформы независимо от наличия посттрансляционной модификации (например, фосфорилирования, гликирования или ацетилирования). Существует шесть основных изоформ (вариантов сплайсинга) тау, встречающихся в мозге человека. Самый длинный из этих вариантов имеет 441 аминокислоту, от которых отщепляется начальный остаток метионина. Остатки пронумерованы в соответствии с изоформой 441. Таким образом, например, указание на фосфорилирование в позиции 404 означает позицию 404 изоформы 441 или соответствующую позицию любой другой изоформы при максимальном вырывании с изоформой 441. Аминокислотные последовательности этих изоформ и номера Swiss-Prot представлены ниже.



P10636-8 (SEQ ID №:1)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVSKTI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
310	320	330	340	350	360
PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKFDKRV	QSKIGSLDNI
370	380	390	400	410	420
THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
430	440				
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

P10636-7 (SEQ ID №:2)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLTPPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGSVQIV	YKPVDLSKVT	KCGSLGNIH
310	320	330	340	350	360
HKPGGGQVEV	KSEKLDKFDK	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
370	380	390	400	410	
AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPLATLA	DEVSASLAKQ	GL

P10636-6 (SEQ ID №:3)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEAEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
250	260	270	280	290	300
HVPGGGSVQI	VYKPVDSKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDKFD	RVQSKIGSLD
310	320	330	340	350	360
NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKAKTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSPRHL	SNVSSTGSID
370	380				
MVDSPQLATL	ADEVASLAK	QGL			

P10636-5 (SEQ ID №:4)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
310	320	330	340	350	360
PGGGQVEVKS	EKLDKFDKRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFRFN	AKAKTDHGAE
370	380	390	400	410	
IVYKSPVVS	DTSPRHLSNV	SSTGSIDMVD	SPQLATLADE	VSASLAKQGL	

P10636-4 (SEQ ID №:5)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLTPPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ

```

      250      260      270      280      290      300
PGGGKVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
      310      320      330      340      350      360
THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLN VSSTGSIDMV
      370      380
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

P10636-2 (SEQ ID №:6)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA

      70      80      90      100     110     120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA

      130     140     150     160     170     180
PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTF PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

      190     200     210     220     230     240
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDSLKV TSKCGSLGNIH

      250     260     270     280     290     300
HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG

      310     320     330     340     350
AEIVYKSPVV SGGTSPRHLN NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

```

Указания на тау включают известные природные вариации, примерно 30 из которых занесены в базу данных Swiss-Prot, и их пермутации, а также мутации, патологии, ассоциированные с тау, такие как деменция, болезнь Пика, надъядерный паралич и т.д. (см., например, базу данных Swiss-Prot и Poorkaj, et al. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Некоторые примеры мутаций тау, пронумерованные по изоформе 441, представляют собой мутацию лизина на треонин в аминокислотном остатке 257 (K257T), мутацию изолейцина на валин в аминокислотной позиции 260 (I260V); мутацию глицина на валин в аминокислотной позиции 272 (G272V); мутацию аспарагина на лизин в аминокислотной позиции 279 (N279K); мутацию аспарагина на гистидин в аминокислотной позиции 296 (N296H); мутацию пролина на серин в аминокислотной позиции 301 (P301S); мутацию глицина на валин в аминокислотной позиции 303 (G303V); мутацию серина на аспарагин в позиции 305 (S305N); мутацию глицина на серин в аминокислотной позиции 335 (G335S); мутацию валина на метионин в позиции 337 (V337M); мутацию глутаминовой кислоты на валин в позиции 342 (E342V); лизина на изолейцин в аминокислотной позиции 369 (K369I); глицина на аргинин в аминокислотной позиции 389 (G389R); и аргинина на триптофан в аминокислотной позиции 406 (R406W).

Тау может фосфорилироваться по одному или более аминокислотных остатков, включая тирозин в аминокислотных позициях 18, 29, 97, 310 и 394, серин в аминокислотных позициях 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 и 422 и треонин в аминокислотных позициях 175, 181, 205, 212, 217, 231 и 403.

### III. Антитела.

#### A. Специфичность связывания и функциональные свойства.

В изобретении предложены антитела, которые связываются с тау. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 23-46 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 25-44 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 28-41 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-36 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 33-39 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 33-36 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, включая остатки 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела связываются с тау независимо от состояния фосфорилирования. Некоторые антитела связываются с эпитопом, не включая остаток, подвергшийся фосфорилированию. Данные антитела можно получить путем иммунизации полипептидом тау, выделенным из природного источника или полученным путем рекомбинантной экспрессии. Антитела можно подвергать скринингу в отношении связывания с тау в нефосфорилированной форме, а также в форме, в которой один или более остатков, поддающихся фосфорилированию, являются фосфорилированными. Такие антитела предпочтительно связываются с неотличимой аффинностью или по меньшей мере с коэффициентом 1,5, 2 или 3 раза с фосфорилированным тау по сравнению с нефосфорилированным тау (т.е. являются "пан-специфическими"). Антитело 16B5 является примером пан-специфического моноклонального антитела. Настоящее изобретение также предлагает антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и любые из вышеуказанных антител, таких как, например, с эпитопом для 16B5. Также

включены антитела, конкурирующие за связывание с тау с любым из вышеуказанных антител, таких как, например, конкурирующие с 16B5.

Вышеуказанные антитела можно получить *de novo* путем иммунизации пептидом, содержащим остатки 23-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID NO: 1, или путем иммунизации полноразмерным полипептидом тау или его фрагментом, содержащим такие остатки, и путем скрининга в отношении специфического связывания с пептидом, включающим такие остатки. Такие пептиды предпочтительно присоединены к гетерогенной конъюгированной молекуле, которая способствует выработке антительного ответа на пептид. Присоединение может происходить напрямую или через спейсерный пептид или аминокислоту. Цистеин применяют в качестве спейсерной аминокислоты, потому что его свободная SH-группа облегчает прикрепление к молекуле-носителю. Также можно применять полиглициновый линкер (например, 2-6 глицинов), с наличием или отсутствием остатка цистеина между глицинами, и пептид. Молекула-носитель служит для обеспечения Т-клеточного эпитопа, который способствует выработке антительного ответа на пептид. Некоторые носители широко используются, в частности гемоцианин фисуреллы (KLH), овалбумин и бычий сывороточный альбумин (БСА). Пептидные спейсеры можно добавлять к пептидному иммуногену при твердофазном пептидном синтезе. Носители обычно добавляют путем химического сшивания. Некоторые примеры химических сшивающих агентов, которые можно применять, включают сложный эфир кросс-N-малеимида-6-аминокапроила или m-малеимидабензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS) (см., например, Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Simaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635 и Southwood et al. *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). При наличии носителя и спейсера они могут прикрепляться к любому концу иммуногена.

Пептид необязательно со спейсером и носителем можно применять для иммунизации лабораторных животных или В-клеток, как описано более подробно ниже. Супернатанты гибридом можно проверять на способность связывать один или более пептидов, включающих остатки 24-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или фосфорилированные и нефосфорилированные формы тау, такие как, например, полноразмерные изоформы тау с позицией 404 в фосфорилированной форме. Пептид может быть присоединен к носителю или другой метке для облегчения скрининг-анализа. В этом случае носитель или метка предпочтительно отличаются от комбинации спейсера и молекулы-носителя, применяемых для иммунизации, чтобы устранить антитела, специфичные для спейсера или носителя, а не пептида тау. Можно применять любую из изоформ тау.

Антитела, имеющие специфичность связывания выбранного антитела мыши (например, 16B5), также можно получить с помощью варианта метода фагового дисплея; смотри, Winter, WO 92/20791. Данный способ особенно подходит для получения антител человека. В данном способе в качестве исходного материала применяют переменную область тяжелой или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, построена фаговая библиотека, члены которой отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (т.е. исходный материал мыши) и отличную переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи, например, можно получить в библиотеке перестроенных переменных областей тяжелой цепи человека. Выбирают фаг, обнаруживающий сильное специфическое связывание с требуемой мишенью (например, тау пептидом) (например, по меньшей мере  $10^8$  и предпочтительно по меньшей мере  $10^9$   $M^{-1}$ ). Переменная область тяжелой цепи из этого фага затем служит в качестве исходного материала для конструирования дополнительной фаговой библиотеки. В данной библиотеке каждый фаг отображает одну и ту же переменную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную в первой фаговой библиотеке) и отличную переменную область легкой цепи. Переменные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки перестроенных переменных областей легкой цепи. И снова выбирают фаг, обнаруживающий сильное специфическое связывание с требуемой мишенью. Полученные антитела обычно имеют одинаковую или схожую эпитопную специфичность, что и исходный материал мыши.

Другие антитела можно получить путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи типичного антитела, такого как 16B5. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере 90, 95 и 99% идентичны аминокислотной последовательности зрелых переменных областей тяжелой и/или легкой цепи 16B5 и поддерживают свои функциональные свойства, и/или кото-

рые отличаются от соответствующих антител на небольшое количество функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замещений), делеций или вставок. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну и предпочтительно все шесть CDR, как определено по Кабату, которые на 90, 95, 99 или 100% идентичны соответствующим CDR 16B5.

В. Антитела видов, не относящихся к человеку.

Получение других нечеловеческих моноклональных антител, например мыши, морских свинок, приматов, кроличьих или крысиных, против иммуногена можно осуществить, например, путем иммунизации животного иммуногеном, как описано выше; см. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включено в качестве ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника путем пептидного синтеза или рекомбинантной экспрессии.

Необязательно, иммуноген можно вводить с адъювантом. Может применять несколько типов адъюванта, как описано ниже. Полный адъювант Фрейнда с последующим неполным адъювантом является предпочтительным для иммунизации лабораторных животных. Для получения поликлональных антител обычно применяют кроликов или морских свинок. Для получения моноклональных антител обычно применяют мышей. Проводят скрининг антител на специфическое связывание. Необязательно далее проводят скрининг антител на связывание с конкретной областью тау. Такой скрининг можно осуществить путем определения связывания антитела с коллекцией мутантов с делецией тау и определением того, какие мутанты с делецией связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, с помощью вестерн-блоттинга, флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS™) или ИФА.

С. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генно-инженерное антитело, в котором CDR от нечеловеческого "донорного" антитела (например, 16B5) привиты на последовательности "акцепторных" антител человека (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539, Carter, US 6407213, Adair, US 5859205 6881557, Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность антител человека или последовательность зародышевой области (germline region sequence). Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее несколько или все CDR, полностью или в значительной степени из донорного антитела, и последовательности переменных областей каркасных участков и константные области, если они присутствуют, полностью или в значительной степени из последовательностей антител человека. Аналогично гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или в значительной степени из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность переменной области каркасного участка тяжелой цепи (heavy chain variable region framework sequence) и константную область тяжелой цепи, если они присутствуют, в значительной степени из последовательности переменной области каркасного участка тяжелой цепи и последовательности константной области человека. Аналогично гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или в значительной степени из легкой цепи донорного антитела, и последовательность переменной области каркасного участка легкой цепи и константную область легкой цепи, если они присутствуют, в значительной степени из последовательностей переменной области каркасного участка легкой цепи и последовательности константной области человека. Кроме нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе в значительной степени из соответствующей CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабату) идентичны между соответствующими CDR. Последовательность переменной области каркасного участка цепи антитела или константная область цепи антитела состоит в значительной степени из последовательности переменной области каркасного участка человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере идентичны 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, как определено по Кабату.

Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно как определено по Кабату) из антитела мыши, они также могут состоять из менее чем всех CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5), CDR из антитела мыши (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

В некоторых антителах только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не в SDR, могут быть определены на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не требуются), из областей CDR Кабата, лежащих за пределами гиперпеременной петли Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), их молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в позициях, в которых отсутствует один или более донорских остатков CDR или в которых опущен весь донор CR, аминокислота, занимающая позицию, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующую позицию (по нумерации Кабата)

в последовательности акцепторного антитела. Число таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR для включения отражает баланс конкурирующих факторов. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизованном антителе и вследствие этого уменьшения потенциальной иммуногенности. Тем не менее, замены могут также вызвать изменения аффинности и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Позиции для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также можно выбрать эмпирически.

Последовательности акцепторного антитела человека необязательно могут быть выбраны из множества известных последовательностей антител человека для обеспечения высокой степени идентичности последовательности (например, 65-85% идентичности) между акцепторной последовательностью варибельной области каркасных участков человека и соответствующими варибельными областями каркасных участков цепи донорного антитела.

Некоторые аминокислоты из остатков варибельной области каркасного участка человека могут быть выбраны для замещения на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование такого возможного влияния осуществляется путем моделирования, оценки характеристик аминокислот в конкретных местах или путем эмпирических наблюдений эффектов замещения или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, когда аминокислота в остатке варибельной области каркасного участка мыши отличается от выбранного остатка варибельной области каркасного участка человека, аминокислота в каркасном участке человека может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасной области из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) непосредственно нековалентно связывается с антигеном;
- (2) является смежной с областью CDR;
- (3) иным способом взаимодействует с областью CDR (например, находится примерно в 6 Å от области CDR) (например, определена путем моделирования легкой или тяжелой цепи на раскрытой структуре гомологичной цепи известного иммуноглобулина) и
- (4) остаток участвует в зоне контакта VL-VH.

Остатки каркасного участка классов (1)-(3), как определено по Квину, US 5530101, иногда иначе называют каноническим и верньерными остатками. Остатки каркасного участка, устанавливающие канонический класс CDR донорной петли и определяющие конформацию CDR петли, иногда называют каноническими остатками (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996). Слой остатков каркасного участка, который поддерживает антигенсвязывающую конформацию петли, играющий роль в тонкой настройке подгонки антитела к антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, 1992, J Mol Biol. 224, 487-499). Другими кандидатами для замещения являются остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Другими кандидатами для замещения являются акцепторные аминокислоты каркасного участка человека, которые необычны для данного положения в иммуноглобулине человека. Эти аминокислоты могут быть замещены аминокислотами из эквивалентной позиции донорного антитела мыши или из эквивалентных позиций более типичных иммуноглобулинов человека. Другими кандидатами на замещения являются акцепторные аминокислоты каркасного участка человека, которые необычны для данного положения в иммуноглобулине человека.

Изобретение относится к гуманизованным формам антитела мыши 16B5. Антитело мыши содержит аминокислотные последовательности зрелых варибельных областей тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 10 и 16, соответственно. В изобретении предложены одна иллюстративная гуманизованная зрелая варибельная область тяжелой цепи (H1) и три иллюстративных гуманизованных зрелых варибельных области легкой цепи (L1, L2 и L3). Вариант H1L2 имеет такую же или лучшую аффинность, как химерное 16B5, и семь обратных мутаций. H1L1 и H1L3 имеет аналогичную аффинность как химерное 16B5 и шесть обратных мутаций.

Изобретение обеспечивает варианты H1L2 гуманизованного антитела 16B5, в которой гуманизованная зрелая варибельная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, гуманизованная зрелая варибельная область легкой цепи по меньшей мере на 90, 95, 96, 97 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 22. Предпочтительно в таких антителах сохраняются некоторые или все из обратных мутаций в H1L2. Другим словами, по меньшей мере 1, 2 или 3 позиции H13 заняты К, позиция H48 занята М и позиция H91 занята F. Предпочтительно по меньшей мере 1, 2, 3 или все четыре позиции L1 заняты N, позиция L4 занята L, позиция L36 занята F и позиция L43 занята S. Области CDR таких гуманизованных антител предпочтительно идентичны или по существу идентичны CDR областям H1L2, которые являются такими же, как в донорном антителе мыши. Области CDR могут быть определены с помощью любого обычного определения (например, Чотиа), но предпочтительно, как определено по Кабату.

Одна из возможностей для дополнительного изменения в вариантах 16B5 представляет собой дополнительные обратные мутации в варибельной области каркасных участков. Многие из каркасных остатков, не контактирующие с CDR в гуманизованном моноклональном антителе, могут содержать аминокислотные замены из соответствующих позиций донорного моноклонального антитела мыши или

других антител мыши или человека, и даже многие из остатков, потенциально контактирующих с CDR, также поддаются замещению, или даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, на остатки, находящиеся в соответствующей позиции акцепторной последовательности человека, применяются для обеспечения варибельной области каркасных участков. Кроме того, альтернативные акцепторные последовательности человека можно применять, например, для тяжелой и/или легкой цепи. Если применяют различные акцепторные последовательности, то одну или более обратных мутаций, рекомендуемых выше, не возможно выполнить, потому что соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратной мутации. Например, при использовании акцепторной последовательности тяжелой цепи, в которой позиция H13 уже занята К, уже не нужна обратная мутация.

Изобретение также включает гуманизированные антитела, в которых зрелые варибельные области легкой и тяжелой цепи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности со зрелыми варибельными областями легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела 16B5 H1L1 (SEQ ID NO: 21 и 15, соответственно) или гуманизированного антитела 16B5 H1L3 (SEQ ID NO: 23 и 15, соответственно).

#### D. Химерные и венированные антитела.

В настоящем изобретении также предложены химерные и венированные формы антител видов, не относящихся к человеку, в частности антитела 16B5.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые варибельные области легкой и тяжелой цепей антитела вида, не относящегося к человеку, (например, мыши) скомбинированы с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела существенно или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и примерно две трети последовательности человека.

Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и обычно все CDR, и некоторые из остатков нечеловеческой варибельной области каркасных участков нечеловеческого антитела, но заменяет другие остатки варибельной области каркасных участков, которые могут вносить вклад в эпитопы В- или Т-клеток, например остатки, подвергшиеся воздействию (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991), на остатки на соответствующих позициях последовательности антитела человека. В результате получается антитело, в котором CDR полностью или в большей степени образованно из нечеловеческого антитела, и варибельные области каркасных участков нечеловеческого антитела сделаны более очеловеченными благодаря заменам. Венированные формы любого антитела 16B5 включены в настоящее изобретение.

#### E. Антитела человека.

Антитела человека к тау получают при помощи различных методов, описанных ниже. Способы получения антител человека включают триомный (trioma) способ из Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman et al., патент США № 4634666, применение трансгенных мышей, включая гены иммуноглобулина человека (см., например, Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); US 5877397, US 5874299, US 5814318, US 5789650, US 5770429, US 5661016, US 5633425, US 5625126, US 5569825, US 5545806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) и способы фагового дисплея (см., например, Dower et al., WO 91/17271 и McCafferty et al., WO 92/01047, US 5877218, US 5871907, US 5858657, US 5837242, US 5733743 и US 5565332).

#### F. Выбор константной области.

Варибельные области тяжелой и легкой цепей из химерных, гуманизированных (включая венированные) или антител человека могут быть соединены по меньшей мере с частью константной области человека. Выбор константной области зависит, в частности, требуется ли антителозависимая комплемент и/или клеточно-опосредованная цитотоксичность. Например, изотипы человека IgG1 и IgG3 обладают комплемент-опосредованной цитотоксичностью, тогда как изотипы человека IgG2 и IgG4 не имеют или имеют слабую комплемент-опосредованную цитотоксичность. Константные области легких цепей могут быть лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться как тетрамеры, содержащие две легкие и две тяжелые цепи, как отдельные тяжелые цепи, легкие цепи, как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, или одноцепочечные антитела, в которых варибельные области тяжелой и легкой цепи соединены через спейсер.

Константные области человека показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между разными индивидуумами, то есть константные области могут отличаться у разных индивидуумов в одной или более полиморфных позициях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов в том, что в сыворотке, распознающей изоаллотип, связываются с неполиморфной областью одного или более других. Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих полиморфные позиции в природных аллотипах, или до 3, 5 или 10 замен для уменьшения или увеличения эффекторной функции, как описано ниже.

Одна или несколько аминокислот на amino- или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, например, таком как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут быть опущены, или могут быть получены производные для части или всех молекул. Замены могут происходить в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксич-

ность или антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления периода полураспада в организме человека (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Примеры замен включают глутамин в позиции 250 и/или лейцин в позиции 428 (в этом параграфе для константной области используется нумерация ЕС) для увеличения периода полураспада антитела. Замена любой или всех позиций 234, 235, 236 и /или 237 уменьшает аффинность рецепторов Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., например, US 6624821). Замена аланина в позициях 234, 235 и 237 IgG1 человека является предпочтительной для снижения эффекторных функций. Необязательно, позиции 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещены на аланин и позиция 235 на глутамин (см., например, US 5624821.)

#### G. Экспрессия рекомбинантных антител.

Химерные, гуманизированные (включая венеризированные) и антитела человека обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, можно оптимизировать в отношении кодонов для экспрессии в желаемом типе клеток (например, CHO или Sp2/0). Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области тяжелой и легкой цепи 16B5, описанные в настоящей заявке, имеют последовательности, содержащие или состоящие, например, из SEQ ID NO: 25 (кодирует Hu16B5 H1), SEQ ID NO: 26 (кодирует Hu16B5 L1), SEQ ID NO: 27 (кодирует Hu16B5 L2), или SEQ ID NO: 28 (кодирует Hu16B5 L3). Для переменных областей, включая сигнальные пептиды, такие как SEQ ID NO: 10 и 16, нуклеиновая кислота может кодировать переменную область с наличием или отсутствием сигнального пептида. Сегменты нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут присутствовать на той же сопряженной молекуле нуклеиновой кислоты или на отдельных молекулах. Тяжелые и легкие цепи могут экспрессироваться одним и тем же вектором или различными векторами. Нуклеиновые кислоты обычно предлагаются в выделенном виде.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области тяжелой цепи 16B5, могут быть соединены с сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующим константную область IgG1 человека, например, имеющую последовательность SEQ ID NO: 30. Такие нуклеиновые кислоты могут также содержать интрон, расположенный между сегментами, кодирующими переменную область тяжелой цепи и константную область IgG1, т.е. от 5' к сегменту, кодирующему константную область. Иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константную область IgG1 человека и имеющая интрон мыши на своем 5'-конце, показана в SEQ ID NO: 31.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области легкой цепи 16B5, могут быть соединены с сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующим каппа-константную область человека, например, имеющую последовательность SEQ ID NO: 33. Такие нуклеиновые кислоты также могут содержать интрон между сегментами, кодирующими переменную область легкой цепи и каппа-константную область (т.е. от 5' к каппа-константной области). Иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая каппа-константную область человека и имеющая интрон человека на своем 5'-конце, показана в SEQ ID NO: 34.

Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают последовательность, контролирующую экспрессию, функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно последовательности, контролирующие экспрессию, представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев. После того, как вектор включили в соответствующего хозяина, хозяина выдерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и сбора и очистки перекрестно реагирующих антител. Вектор или векторы, кодирующие цепи антител, могут также содержать селективируемый ген, например ген дигидрофолатредуктазы или глутаминсинтетазы, который разрешает амплификацию числа копий нуклеиновых кислот, кодирующих цепи антитела.

*E. coli* представляет собой прокариотическую клетку-хозяина, особенно подходящую для экспрессии антител, в частности фрагментов антител. Микроорганизмы, такие как дрожжи, также пригодны для экспрессии. *Saccharomyces* является предпочтительным дрожжевым хозяином, с подходящими векторами, имеющими последовательности, контролирующие экспрессию, ориджин репликации, последовательности терминации и тому подобное по необходимости. Типичные промоторы содержат 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые промоторы дрожжей включают, помимо прочих, промоторы алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты; см. Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают клеточные линии CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и клетки миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки являются нечеловеческими. Векторы экспрессии для данных клеток могут содержать последовательности, контролирующие экспрессию, та-

кие как ориджин репликации, промотор, энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительные последовательности, контролируемые экспрессию, представляют собой промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п.; см. Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

После введения вектора(ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела, в культуру клеток, клеточный пул можно подвергнуть скринингу на рост производительности и качество продукта в бессывороточной среде. Высокопродуктивные клеточные пулы затем могут быть подвергнуты клонированию отдельных клеток на основании FACS-анализа для получения моноклональных линий. Предпочтительными являются удельные производительности выше 50 или 100 пг на клетку в день, которые соответствуют титру продукции в более 7,5 г/л культуры. Антитела, полученные из клонов одной клетки, также могут быть проверены на мутность, фильтрационные свойства, при помощи ПААГ, ИЭФ, УФ-сканирования, высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC), олигосахаридного картирования, масс-спектрометрии и анализа на связывание, такого как ИФА или Вiascote анализа. Затем выбранный клон можно распределить по нескольким флаконам и хранить в замороженном виде для дальнейшего использования.

После экспрессии антитела можно очищать в соответствии со стандартными процедурами данной области техники, включая захват белком А, хроматографию на колонке (например, гидрофобное взаимодействие или ионообменное), низкий pH для инактивации вирусов и т.п. (в общем см. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Можно применять методы коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, выбор промоторов, элементов транскрипции и терминаторов, клонирование единичных клеток в бессывороточной среде, создание банка клеток, применение селективных маркеров для амплификации числа копий, СНО терминатора, клонирование единичных клеток в среде с сывороткой, улучшение титра белка (см., например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, WO 2004/050884, WO 2008/012142, WO 2008/012142, WO 2005/019442, WO 2008/107388 и WO 2009/027471 и US 5888809).

#### IV. Активные иммуногены.

Агент, применяемый для активной иммунизации, служит для индукции у пациента таких же типов антител, описанных выше, в связи с пассивной иммунизацией. Агенты, применяемые для активной иммунизации, могут представлять собой такие же типы иммуногенов, применяемые для образования моноклональных антител у лабораторных животных, например пептид из 3-15 или 3-12 или 5-12, или 5-8 последовательных аминокислот из области тау, соответствующих остаткам 23-46, 25-44, 28-41 или 30-39 последовательности SEQ ID NO: 1, такой как, например, пептид, содержащий остатки 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 последовательности SEQ ID NO: 1. Для индуцируемых антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом 16B5, можно отобразить эпитопную специфичность данных антител (например, путем проверки связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих тау). Фрагмент тау, состоящий или включающий или перекрывающийся с эпитопом, можно применять в качестве иммуногена. Такие фрагменты обычно применяют в нефосфорилированной форме.

Если применяется гетерологичный носитель и адъювант, то он может быть таким же, как для генерации моноклональных антител, но также может быть выбран для лучшей фармацевтической пригодности для применения людьми. Подходящие носители включают сывороточные альбумины, гемоглобин, фибриноген, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин или анатоксин других патогенных бактерий, таких как дифтерийная палочка (например, CRM197), *E. coli*, холерный вибрион или *H. pylori*, или ослабленное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты можно получить путем связывания агентов согласно изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерилцистеином (Pam<sub>3</sub>Cys), маннаном (полимером маннозы) или глюканом ( $\alpha$   $\beta$  1 $\rightarrow$ 2 полимером)), цитокинами (например, IL-1, IL-1  $\alpha$  и  $\beta$  пептидами, IL-2,  $\gamma$ -INF, IL-10, GM-CSF) и хемокинами (например, MIP1- $\alpha$  и  $\beta$ , и регулируемый при активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками (RANTES)). Иммуногены могут быть соединены с носителями с наличием или отсутствием спейсерных аминокислот (например, глицин-глицин). Дополнительные носители включают вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (VLP), называемые также псевдовиреоны или производные вирусных частиц, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из нескольких копий вирусного капсида и/или белка оболочки, способных к самостоятельной сборке *in vivo* в VLP в определенной сферической симметрии (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415). Альтернативно, пептидные иммуногены могут быть связаны по меньшей мере с одним искусственным Т-клеточным эпитопом, спо-



способным связываться с большей частью молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, например пан DR-эпитоп ("PADRE"). PADRE, описан в US 5736142, WO 95/07707, и Alexander J. et al., *Immunity*, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в многомерной форме, в которой несколько копий иммуногена и/или его носитель представлены как одна ковалентная молекула.

Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Адьювант увеличивает титр индукции антител и/или аффинность связывания индуцированных антител по сравнению со случаем, когда пептид применяют один. Для выработки иммунного ответа можно применять разнообразные адьюванты в сочетании с иммуногенным фрагментом тау. Предпочтительные адьюванты увеличивают характерную реакцию на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, которые влияют на качественный вид ответа. Предпочтительные адьюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3-де-О-ацилированный монофосфорилипид А (MPL™) (смотри GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, в настоящее время часть Corixa). Стимулон Stimulon™ QS-21 это тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, найденного в Южной Америке (смотри Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, M.A.; now Antigenics, Inc., New York, NY). Другие адьюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), обязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфорилипид А (смотри Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), плурононовые полимеры и убитые микобактерии. Адьюванты Ribi представляют собой эмульсии масло-в-воде. Ribi содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное с физиологическим раствором, содержащим твин 80. Ribi также содержит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют как иммуностимуляторы, и бактериальный монофосфорилипид А. Другой адьювант представляет собой CpG (WO 98/40100). Адьюванты могут вводиться в качестве компонента терапевтической композиции с активным веществом или могут вводиться отдельно, до, одновременно или после введения терапевтического агента.

Также могут применяться аналоги природных фрагментов тау, которые вызывают антитела к тау. Например, в таких пептидах одна или более или все L-аминокислоты могут быть замещены D-аминокислотами. Порядок аминокислот также может быть изменен в противоположном направлении (ретропептид). Необязательно пептид содержит все D-аминокислоты в обратном порядке (ретроинверсный пептид). Пептиды и другие соединения, которые не обязательно имеют значительное сходство с аминокислотной последовательностью с пептидами тау, но, тем не менее, служат как имитаторы пептидов тау, вызывают подобный иммунный ответ. Также могут применяться антиидиотипические антитела к моноклональным антителам к тау, как описано выше. Такие анти-Id антитела имитируют антиген и вызывают иммунный ответ на него (смотри, *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

Пептиды (и необязательно носитель, сшитый с пептидом) можно также вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид и экспрессирующейся у пациента *in situ*. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно связан с регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые разрешают экспрессию сегмента ДНК в желаемых клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, что желательно для индукции иммунного ответа, элементы промотора и энхансера из генов легких или тяжелых цепей иммуноглобулина или главный предданный промотор и энхансер ЦМВ, пригодны для управления экспрессией. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в вектор. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи антитела. Если присутствуют обе тяжелые и легкие цепи, предпочтительно цепи связаны как одноцепочечное антитело. Антитела для пассивного введения также можно получить, например, с помощью аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, получавших пептидные иммуногены.

ДНК может доставляться в открытом виде (т.е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). Альтернативно можно применять несколько вирусных векторных систем, включая ретровирусные системы (см., например, Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, Bett et al., *J. Virol.* 67, 591 1 (1993)); адено-ассоциированные вирусные векторы (см., например, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), вирусные векторы из семейства поксвирусов, включая вирус осповакцины и вирус птичьей оспы, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как производные вирусов Синдбис и леса Семлики (см., например, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (see US 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус ветряночного стоматита (см. WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 and Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ДНК, кодирующую иммуноген, или содержащий ее вектор, можно упаковать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в патентах US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующие иммуноген, также можно адсорбировать или связать с носителями в виде частиц, примеры которых включают полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды и

сополимеры лактида и гликолида (см., например, McGee et al., *J. Micro Encap.* 1996).

#### V. Методы скрининга.

Антитела можно первоначально подвергать скринингу в отношении предполагаемой специфичности связывания, как описано выше. Активные иммуногены также можно подвергать скринингу на способность индуцировать антитела с такой специфичностью связывания. В данном случае активный иммуноген применяют для иммунизации лабораторного животного и полученную сыворотку тестируют на соответствующую специфичность связывания.

Антитела, имеющие требуемую специфичность связывания, затем можно тестировать на клеточных и животных моделях. Клетки, применяемые для такого скрининга, преимущественно представляют собой нервные клетки. Сообщалось о клеточной модели патологии тау, в которой клетки нейробластомы трансфицировали четырьмя повторными доменами тау, необязательно с мутацией, ассоциированной с патологией тау (например, дельта K280, смотри Khlistunova, *Curent Alzheimer Research* 4, 544-546 (2007)). В другой модели тау индуцируется в клеточной линии нейробластомы N2a путем добавления доксициклина. Клеточные модели позволяют изучать токсичность тау для клеток в растворимом или агрегированном состоянии, внешний вид агрегатов тау после включения экспрессии гена тау, растворение агрегатов тау после повторного включения экспрессии гена и эффективность антител ингибировать образование агрегатов тау или дезагрегировать их.

Антитела или активные иммуногены также можно подвергать скринингу в трансгенных животных моделях заболеваний, ассоциированных с тау. Такие трансгенные животные могут содержать трансген тау (например, любую из изоформ человека) и, необязательно, трансген APP человека среди других, такие как киназа, которая фосфорилирует тау, AroE, пресенилин или синуклеин. Такие трансгенные животные предрасположены к развитию у них по меньшей мере одного симптома или признака заболевания, ассоциированного с тау.

Иллюстративным трансгенным животным является линия мышей K3 (Itner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(41): 15997-6002 (2008)). Данные мыши имеют трансген тау человека с мутацией K 369 I (мутация, ассоциированная с болезнью Пика) и Thy 1.2 промотор. Данная модель показывает быстрый ход нейродегенерации, двигательный дефект и дегенерацию афферентных волокон и гранулярных клеток мозжечка. Другим иллюстративным животным является линия мышей pR5. Данные мыши имеют трансген тау человека с мутацией P301L (мутация, ассоциированная с лобно-височной деменцией) и Thy 1.2 промотор (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., *Nat Genet.* 25:402-405 (2000)). Эти мыши имеют более плавный ход нейродегенерации. У мышей развиваются нейрофибриллярные клубки в нескольких регионах головного и спинного мозга, что включено во всей своей полноте посредством ссылки. Она представляет собой отличную модель для изучения последствий развития клубков и скрининга терапии, которая может ингибировать образование данных агрегатов. Еще одно преимущество данных животных заключается в относительно раннем начале патологии. В гомозиготной линии поведенческие аномалии, ассоциированные с патологией тау можно наблюдать по меньшей мере уже в 3 месяца, но животные остаются относительно здоровыми по меньшей мере до 8-месячного возраста. Другими словами, в 8 месяцев животные передвигаются, кормятся и могут выполнять поведенческие задачи достаточно хорошо, чтобы была возможность наблюдения эффекта лечения. Активная иммунизация этих мышей в 6-13 месяцев при помощи AI wI KLN-PHF-1 образует титры примерно 1000 и показывает меньше нейрофибриллярных клубков, меньше pSer422, и уменьшение потери веса по сравнению с необработанными контрольными мышами.

Активность антител или активных агентов можно оценивать по различным критериям, включая снижение количества общего тау или фосфорилированного тау, уменьшение других патологических характеристик, таких как амилоидные отложения A $\beta$ , и ингибирование или задержку расстройства поведения. Активные иммуногены также можно проверять на индукцию антител в сыворотке. И активные, и пассивные иммуногены можно проверять на прохождение через антитела гематоэнцефалический барьер в головной мозг трансгенного животного. Антитела или фрагменты, индуцирующие антитела, также можно проверять на приматах, кроме человека, у которых естественно или через индукцию развиваются симптомы заболеваний, связанных с тау. Тестирование антитела или активного агента обычно выполняют вместе с контролем, при котором проводят параллельный эксперимент, где отсутствует антитело или активный агент (например, заменен на носитель). Уменьшение, задержку или ингибирование признаков или симптомов болезни, связанных с тестируемым антителом или активным агентом, можно оценивать относительно контроля.

#### VI. Пациенты, подлежащие лечению.

Наличие нейрофибриллярных клубков было обнаружено при нескольких заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, умеренные когнитивные нарушения, постэнцефалитический паркинсонизм, посттравматическую деменцию или деменцию боксеров, болезнь Ниман-Пика типа C, надъядерный паралич, лобно-височную деменцию, лобно-височную лобарную дегенерацию, гуамский комплекс амиотрофического бокового склероза и деменции при болезни Паркинсона, и прогрессирующий надъядерный паралич PSP. Настоящие режимы также можно применять для лечения или профилактики любого из этих заболеваний. Из-за широкой связи между неврологическими заболеваниями и состоя-

ниями и тау настоящие режимы можно применять для лечения или профилактики у любого субъекта, показывающего повышенные уровни тау или фосфорилированного тау (например, в СМЖ), по сравнению со средним значением у лиц без неврологических заболеваний. Настоящие режимы также можно применять для лечения или профилактики неврологических заболеваний у лиц, имеющих мутацию в тау, ассоциированную с неврологическим заболеванием. Настоящие способы, в частности, пригодны для лечения или профилактики болезни Альцгеймера, и особенно у больных.

Пациенты, подлежащие лечению, включают лиц, подверженных риску заболевания, но не проявляющих симптомов, а также пациентов, данный момент проявляющих симптомы. Пациенты с риском заболевания включают тех, которые имеют известный генетический риск заболевания. Такие люди включают тех, чьи родственники пережили эту болезнь, и тех, у кого риск выявили путем анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска включают мутации в тау, такие как обсуждались выше, а также другие мутации в генах, связанных с неврологическим заболеванием. Например, аллель ApoE4 в гетерозиготной, а тем более в гомозиготной форме, связана с риском болезни Альцгеймера. Другие маркеры риска болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности в мутации в позиции 717 и позициях 670 и 671, называемые мутациями Харди и шведскими мутациями, соответственно, мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, семейный анамнез болезни Альцгеймера, гиперхолестеринемия или атеросклероз. Лиц, страдающих от болезни Альцгеймера в настоящее время, можно выявить благодаря ПЭТ, из характерной деменции, а также при наличии факторов риска, описанных выше. Кроме того, для выявления лиц с болезнью Альцгеймера доступен ряд диагностических тестов. Они включают измерение уровней тау или фосфо-тау и A $\beta$ 42 в СМЖ. Повышенные уровни тау или фосфо-тау и пониженные A $\beta$ 42 сигнализируют о наличии болезни Альцгеймера. Некоторые мутации ассоциированы с болезнью Паркинсона. Ala30Pro или Ala53, или мутации в других генах ассоциированы с болезнью Паркинсона, такие как обогащенная лейциновыми повторами киназа, PARK8. Лиц также можно диагностировать на любые неврологические заболевания, упомянутые выше, по критериям Руководства по диагностике и статистике психических расстройств (DSM IV TR).

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30). Тем не менее, обычно нет необходимости начинать лечение до тех пор, пока пациент не достигнет 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно подразумевает введение множественных доз в течение определенного периода времени. Лечение можно контролировать путем анализа уровня антител в динамике по времени. Если ответ падает, показана ревакцинирующая доза. В случае пациентов с потенциальным синдромом Дауна, лечение можно начать антенатально путем введения терапевтического агента матери или вскоре после рождения.

#### VII. Фармацевтические композиции и способы лечения.

Антитело или агент для индукции антител или их фармацевтическую композицию в профилактических целях вводят пациенту, подверженному риску или иным образом с риском заболевания (например, болезнь Альцгеймера), в режиме (доза, частота и пути введения), эффективном для снижения риска, уменьшения тяжести или задержки наступления по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, предпочтительно режим эффективен для ингибирования или задержки тау или фосфо-тау и спаренных нитей, образующихся из них в мозге, и/или ингибирования или задержки его токсических эффектов, и/или ингибирования/или задержки развития расстройств поведения. Антитело или агент для индукции антител в терапевтических целях вводят пациенту с подозрением на наличие или уже страдающему от заболевания (например, болезнь Альцгеймера) в режиме (доза, частота и пути введения), эффективном для ослабления или по меньшей мере ингибирования дальнейшего ухудшения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. В частности, предпочтительно режим эффективен для уменьшения или по меньшей мере ингибирования дальнейшего увеличения уровней тау, фосфо-тау или спаренных нитей, образующихся из них, связанной токсичности и/или расстройств поведения.

Режим считается терапевтически или профилактически эффективными, если у конкретного пациента, подвергшегося лечению, достигается результат более благоприятный, чем средний результат по сравнению с контрольной популяцией аналогичных пациентов, не подвергавшихся лечению способами согласно настоящему изобретению, или если более благоприятный результат продемонстрирован у пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольными пациентами в контролируемых клинических испытаниях (например, в фазе II, фазе II/III или фазе III испытаний) при уровне  $p < 0,05$  или  $0,01$  или даже  $0,001$ .

Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих факторов, таких как способы введения, целевой сайт, физиологическое состояние пациента, является ли пациент носителем ApoE, является ли пациент человеком или животным, других введенных лекарств, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

Иллюстративный диапазон доз антител составляет примерно от  $0,01$  до  $5$  мг/кг и чаще от  $0,1$  до  $3$  мг/кг или  $0,15$ - $1$  или  $0,15$ - $1,5$  мг/кг массы тела пациента. Антитела можно вводить в таких дозах ежедневно, через день, раз в неделю, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или в соответствии с лю-

бым другим графиком, определенным эмпирическим путем. Иллюстративное лечение включает введение в многократных дозах в течение длительного периода, например в течение по меньшей мере шести месяцев.

Дополнительные примеры схем лечения включают введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев.

Количество агента для активного введения варьирует от 0,1-500 мкг на пациента и чаще от 1-100 или 1-10 мкг на инъекцию для введения человеку. Расписание инъекций может значительно изменяться от одного раза в день до одного раза в год, одного раза в десять лет. Типичный режим состоит из иммунизации с последующими ревакцинирующими инъекциями с интервалами времени, такими как 6 недельные интервалы или два месяца. Другой режим состоит из иммунизации с последующими ревакцинирующими инъекциями спустя 1, 2 и 12 месяцев. Другой режим состоит из инъекции каждые два месяца в течение жизни. Альтернативно, ревакцинирующие инъекции могут быть нерегулярными на основании мониторинга иммунного ответа.

Антитела или агенты для индукции антител предпочтительно вводят посредством периферического пути, т.е. при котором введенное или индуцированное антитело преодолевает гематоэнцефалический барьер для достижения предназначенного сайта в головном мозге. Пути введения включают местный, внутривенный, пероральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, интратекальный, внутрибрюшинный, интраназальный или внутримышечный. Предпочтительные пути введения антител представляют собой внутривенный и подкожный. Предпочтительные пути введения для активной иммунизации представляют собой подкожный и внутримышечный. Данный тип инъекций наиболее часто выполняют в мышцы рук или ног. В некоторых способах агенты вводят непосредственно в конкретную ткань, где накопились отложения, например, путем внутричерепной инъекции.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими и изготовлены в соответствии с условиями GMP. Фармацевтические композиции могут быть представлены в виде дозированной лекарственной формы (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть изготовлены с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных материалов. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций антитела могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, антитела могут быть в лиофилизированной форме для разбавления подходящим носителем перед использованием, например стерильной апиrogenной водой.

Настоящие режимы можно осуществлять в комбинации с введением другого агента, эффективным при лечении или профилактике заболевания, подлежащего лечению. Например, в случае болезни Альцгеймера настоящие режимы можно комбинировать с иммунотерапией против Аβ (WO/2000/072880), ингибиторами холинэстеразы или мемантином, или в случае болезни Паркинсона с иммунотерапией против альфа-синуклина WO/2008/103472, с леводопой, агонистами допамина, ингибиторами катехол-О-метилтрансферазы (COMT), ингибиторами MAO-B, амантадином или антихолинэргическими агентами.

#### VIII. Визуализация *in vivo*, способы диагностики и оптимизация иммунотерапии.

В изобретении предложены способы визуализации *in vivo* отложений тау-белка (например, отложений, нейрофибриллярных клубков и включений тау) у пациента. Способы осуществляют путем введения пациенту реагента, такого как антитело, которое связывается тау (например, мышинные, гуманизированные, химерные или венированные антитела 16B5), а затем обнаружения агента после связывания. Предпочтительны антитела, связывающиеся с эпитопом тау в пределах аминокислот от 24 до 46. В некоторых способах антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот от 25 до 44 или в пределах аминокислот от 30 до 39. Очищающего ответа (clearing response) на вводимые антитела можно избежать или уменьшить при помощи фрагментов антител, в которых не хватает полноразмерной константной области, такой как Fab. В некоторых способах одно и то же антитело может служить в качестве лечашего и диагностического реагента.

В настоящем изобретении также предложены моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 24-46 последовательности SEQ ID NO: 1 (Swiss-Prot № P10636-8). Подобные антитела представляют собой антитела человека, гуманизированные, химерные или венированные антитела. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 25-44 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 30-39 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые антитела связываются с тау в фосфорилированной и нефосфорилированной форме.

Диагностические реагенты можно вводить в тело пациента путем внутривенной инъекции, или непосредственно в мозг путем внутричерепной инъекции, или просверлив отверстие в черепе. Дозировка реагента должна быть в пределах одних и тех же диапазонов, что и для способов лечения. Обычно реагент помечен, хотя в некоторых способах первичный реагент со сродством к тау не помечен, и применя-

ют вторичный помеченный агент для связывания с первичным реагентом. Выбор метки зависит от средств обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Применение парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки также могут быть обнаружены при помощи ПЭТ или ОФЭКТ.

Способы визуализации *in vivo* отложений тау-белка пригодны для диагностики или подтверждения диагноза таупатии, такой как болезнь Альцгеймера, лобно-височной лобарной дегенерации, прогрессирующего надъядерного паралича и болезни Пика, или восприимчивости к такой болезни. Например, способы можно применять на пациентах, у которых присутствуют симптомы деменции. Если у пациента есть аномальные нейрофибриллярные клубки, то, скорее всего, пациент страдает от болезни Альцгеймера. Кроме того, если у пациента есть аномальные включения тау, то в зависимости от расположения включений, пациент может страдать от лобно-височной лобарной дегенерации. Способы также можно применять у бессимптомных пациентов. Наличие аномальных отложений тау-белка указывает восприимчивость к будущим симптомам болезни. Данные способы также пригодны для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на лечение у пациентов, у которых ранее были диагностированы заболевания, ассоциированные с тау.

Диагноз можно поставить путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых локусов с соответствующими базовыми значениями. Базовые значения могут отображать средние уровни в популяции лиц, не имеющих заболевания. Базовые значения также могут представлять собой предыдущие уровни, определенные у данного пациента. Например, базовые значения можно определить у пациента до начала лечения иммунотерапией тау, и в дальнейшем сравнивать измеренные значения с базовыми значениями. Снижение значений относительно базовой линии сигнализирует о положительном ответе на лечение.

У некоторых пациентов диагноз таупатии можно поставить путем выполнения ПЭТ сканирования. ПЭТ сканирование можно выполнять с применением, например, обычного ПЭТ томографа и вспомогательного оборудования. Сканирование обычно включает одну или более областей мозга, в целом известных как ассоциированные с отложениями тау-белка, и одну или более областей в качестве контроля, в которых обычно почти не присутствуют отложения.

Сигнал, полученный при ПЭТ сканировании, можно представить в виде многомерного изображения. Многомерные изображения могут быть в двух измерениях, представляющих поперечное сечение мозга, в трех измерениях, представляющих собой трехмерный мозг, или в четырех измерениях, представляющих собой изменения в трехмерном мозге с течением времени. Можно применять цветовые шкалы с различными цветами, указывающими на различные количества метки, и выведение логическим путем отложений тау-белка. Результаты сканирования также могут быть представлены в цифровой форме, с цифрами, относящимися к количеству обнаруженной метки и, следовательно, к количеству отложений тау-белка. Метки, присутствующие в области головного мозга, которая известна как связанная с отложениями, характерными для конкретной таупатии (например, болезни Альцгеймера), можно сравнивать с метками в области, которая известна как не связанная с отложениями, для получения соотношения, указывающего степень отложения в первой из вышеуказанных областей. Для одного и того же лиганда с радиоактивной меткой такие соотношения обеспечивают сопоставимые величины отложений тау-белка и их изменения между разными пациентами.

В некоторых способах ПЭТ сканирование выполняют одновременно или в тот же визит пациента вместе с МРТ или КТ. МРТ или КТ обеспечивает более анатомическую детализацию мозга, чем ПЭТ. Однако ПЭТ изображение можно наложить на МРТ или КТ изображения для более точного указания локализации ПЭТ лиганда и вывести логическим путем нахождения отложений тау относительно анатомических структур мозга. Некоторые приборы могут выполнять одновременно ПЭТ и МРТ или КТ сканирование без изменения положения пациента между сканированием, что облегчает наложение изображений.

Подходящие ПЭТ-лиганды включают радиоактивно меченные антитела согласно изобретению (например, мышинные, гуманизированные, химерные или венированные антитела 16B5). Можно применять радиоактивный изотоп, например  $C^{11}$ ,  $N^{13}$ ,  $O^{15}$ ,  $F^{18}$  или  $I^{123}$ . Интервал между введением ПЭТ-лиганда и выполнением сканирования может зависеть от ПЭТ-лиганда и, в частности, от скорости его поглощения и выведения в мозге, и периода полураспада его радиоактивной метки.

ПЭТ сканирование также можно выполнять в качестве профилактической меры у пациентов без симптомов или пациентов, которые имеют симптомы умеренных когнитивных нарушений, но у которых еще не диагностировали таупатию, но которые имеют повышенный риск развития таупатии. Для пациентов без симптомов сканирование особенно полезно для лиц, у которых имеется повышенный риск таупатии из-за семейного анамнеза, генетических или биохимических факторов риска или зрелого возраста. Профилактическое сканирование можно начать, например, у пациентов в возрасте между 45 до 75 лет. У некоторых пациентов первое сканирование выполняют в возрасте 50 лет.

Профилактические сканирования можно проводить с интервалом, например, от шести месяцев до десяти лет, предпочтительно между 1-5 годами. У некоторых пациентов профилактические сканирования проводят ежегодно. Если ПЭТ-сканирование, проведенное как профилактическая мера, показало ано-

мально высокие уровни отложений тау-белка, то может быть начата иммунотерапия, а последующие ПЭТ сканирования проводиться у пациентов с диагнозом таупатии. Если ПЭТ-сканирование, проведенное как профилактическая мера, показало нормальные уровни отложений тау-белка, дальнейшие ПЭТ-сканирования можно проводить с интервалом от шести месяцев до 10 лет и предпочтительно 1-5 лет, как и ранее, или в ответ на появление признаков и симптомов таупатии или при умеренных когнитивных нарушениях. Комбинирование профилактических сканирований с введением тау-направленной иммунотерапии, если обнаружены и когда обнаружены отложения тау-белка выше нормального уровня, то можно уменьшить уровни отложений тау-белка до или близко к нормальным уровням, или по меньшей мере подавить дальнейшее увеличение, и у пациента может не развиваться таупатия в течение более длительного периода, чем если бы он не делал профилактические сканирования и тау-направленную иммунотерапию (например, по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 лет или до конца жизни пациента).

Нормальные уровни отложений тау-белка можно определить по количеству нейрофибриллярных клубков или включений тау в мозге репрезентативной выборки лиц из общей популяции, у которых не диагностирована конкретная таупатия (например, болезнь Альцгеймера) и которые рассматриваются как имеющие повышенный риск развития таких заболеваний (например, репрезентативная выборка лиц без заболеваний, находящихся в возрасте до 50 лет). Альтернативно, нормальный уровень может быть признан у отдельного пациента, если в соответствии с настоящими способами сигнал ПЭТ в области головного мозга, в котором известно развитие отложений тау-белка, не отличается (в пределах точности измерений) от сигнала в области мозга, для которой известно, что такие отложения обычно не развиваются. Повышенный уровень для отдельного лица можно установить путем сравнения с нормальными уровнями (например, за пределами среднего значения и величине стандартного отклонения), или просто при увеличении сигнала, выходящем за пределы погрешности эксперимента, в области мозга, ассоциированной с отложениями тау-белка, по сравнению с областью, которая не связана с отложениями. Для целей сравнения уровней отложений тау-белка у отдельных лиц и населения предпочтительно отложения тау-белка должны быть определены в одной и той же области(ях) головного мозга, данные области включают по меньшей мере одну область, в которой как известно образуются отложения тау-белка, ассоциированные с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера). Пациент, имеющий повышенный уровень отложений тау-белка, является кандидатом для начала иммунотерапии.

После начала иммунотерапии уменьшение уровня отложений тау-белка можно первым делом отметить как признак того, что лечение оказывает желаемый эффект. Наблюдаемое снижение может находиться, например, в диапазоне 1-100%, 1-50% или 1-25% от базовой величины. Такие эффекты можно обнаружить в одной или более областях головного мозга, для которых известно образование отложений, или их можно рассчитать из среднего значения таких областей. Общий эффект лечения можно аппроксимировать путем добавления процентного уменьшения относительно базового уровня к увеличению отложений тау-белка, которые в противном случае возникли бы у среднего пациента без лечения.

Поддержание отложений тау-белка на приблизительно постоянном уровне или даже небольшое увеличение отложений тау-белка также может служить признаком ответной реакции на лечение, хотя и неоптимальным ответом. Такие ответы можно сравнивать с динамикой уровней отложений тау-белка у пациентов с конкретной таупатией (например, болезнью Альцгеймера), которые не получили лечение, для определения имеет ли иммунотерапия влияние на ингибирование дальнейшего увеличения отложений тау-белка.

Мониторинг изменений в отложениях тау-белка позволяет корректировать иммунотерапию или другой режим лечения в зависимости от ответа на лечение. ПЭТ-мониторинг обеспечивает показания о характере и степени ответа на лечение. Затем можно выполнить определение, следует ли корректировать лечение, и при необходимости лечение можно откорректировать в зависимости от ПЭТ-мониторинга. Таким образом, ПЭТ-мониторинг позволяет регулировать тау-направленную иммунотерапию или другой режим лечения до получения детектируемого ответа от других биомаркеров, МРТ или умозаключений. Существенное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения по отношению к базовому обеспечивает некоторые доказательства того, что лечение привело или не привело к положительному эффекту. В некоторых случаях изменение значений параметра у пациента обеспечивает доказательства того, что лечение привело или не привело к положительному эффекту. В других случаях изменение значений у пациента, если таковые имеются, сравнивают с изменением значений, если таковые имеются, в контрольной репрезентативной популяции пациентов, не подвергавшихся иммунотерапии. Разница между ответом у конкретного пациента и нормальным ответом у контрольного пациента (например, среднее значение плюс величина стандартного отклонения) также может представлять доказательства того, что режим иммунотерапии привел или не привел к положительному эффекту у пациента.

У некоторых пациентов мониторинг выявляет обнаруживаемое уменьшение отложений тау-белка, но уровень отложений тау-белка остается выше нормы. У таких пациентов, если отсутствуют неприемлемые побочные эффекты, можно продолжать существующий режим лечения или даже увеличивать частоту введения и/или дозу, если уже не достигнута максимально рекомендуемая доза.

Если мониторинг показывает, что уровни отложений тау-белка у пациента уже уменьшились до нормальных или почти нормальных уровней отложений тау-белка, режим иммунотерапии можно отре-

гулировать от индукции (т.е. который снижает уровень отложений тау-белка) до поддержания (т.е. который поддерживает отложения тау-белка на приблизительно постоянном уровне). Такой режим может зависеть от снижения дозы и/или частоты введения иммунотерапии.

У других пациентов мониторинг может показать, что иммунотерапия оказывает некоторый положительный эффект, но неоптимальный эффект. Оптимальный эффект можно определить как процент снижения уровня отложений тау-белка в верхней половине или квартили изменений в отложениях тау-белка (измеряется или рассчитывается по всему мозгу или его репрезентативной области(ях), в которой, как известно, образуются отложения тау-белка), наблюдаемый в репрезентативной выборке пациентов с таупатией, которых подвергают иммунотерапии в данный момент времени после начала терапии. Пациента, у которого наблюдается меньшее сокращение, или пациента, у которого отложения тау-белка остаются постоянными или даже увеличиваются, но в меньшей степени, чем ожидалось при отсутствии иммунотерапии (например, как получено для контрольной группы пациентов, которым не вводили иммунотерапию), можно классифицировать как имеющих положительный, но неоптимальный ответ. Для таких пациентов обязательно можно корректировать режим, при котором увеличивается доза и/или частота введения агента.

У некоторых пациентов отложения тау-белка могут увеличиваться в аналогичной или большей степени до отложений тау у пациентов, не получающих иммунотерапию. Если такое увеличение сохраняется в течение времени, такого как 18 месяцев или 2 года, даже после какого-либо увеличения частоты или дозы агентов, при необходимости можно прекратить иммунотерапию в пользу других процедур.

Вышеприведенное описание диагностики, мониторинга и корректировки лечения таупатий в значительной степени сосредоточено на применении ПЭТ-сканирования. Однако для осуществления таких методов вместо ПЭТ-сканирования можно применять любой другой способ визуализации и/или измерения отложений тау-белка, пригодный для использования антител тау согласно изобретению (например, мышинных, гуманизированных, химерных или венированных антител 16B5).

### Примеры

Пример 1. Получение антитела 16B5.

Пан антитело 16B5, которое распознает, фосфорилирован ли тау ли нет, получали посредством очищенного тау и выбрали на основании его свойств захвата с высокой аффинностью при помощи ИФА анализа.

Пример 2. Клонирование и секвенирование антитела 16B5.

РНК экстрагировали из осажденных клеток, экспрессирующих антитела 16B5 с применением Trizol LS (Invitrogen). Концентрации РНК измеряли при помощи набора Quant-IT (Invitrogen).

Быструю амплификацию концов кДНК 5'-RACE применяли для амплификации 5'-конца мРНК IgG с использованием набора Smart RACE (Clontech). Для реакции с обратной транскрипцией использовали примерно 1 мкг РНК и далее амплифицировали пул кДНК с применением универсального праймера, поставляемого в наборе Smart RACE, а также ген-специфичных праймеров (GSP), сконструированных в ExonBIO.

Последовательности праймеров.

Универсальный праймер: СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГС (SEQ ID №: 7)

GSP:

IgG1 и IgG2a: CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC (SEQ ID №: 8)

IgG2b: CTC AAG TTT TTT GTC CAC CGT GGT GC (SEQ ID №: 9)

ПЦР-продукты очищали в геле и клонировали в тупом векторе pSUPER (Adexon, [www.adexonbiotech.com](http://www.adexonbiotech.com)). Для тяжелой цепи подготавливали и секвенировали 15 колоний. Для легкой цепи выполняли метод молекулярных колоний, чтобы отличить эндогенную aberrантную легкую цепь, и секвенировали только клоны, которые не были амплифицированы в методе молекулярных колоний. Результаты секвенирования анализировали на векторе NTI. Адаптер и праймеры GSP отмечали на карте. Области между адаптером и последовательностями GSP являются последовательностями тяжелой цепи IgG, которые включают лидер, сигнальный пептид и V-область, и часть константной области. На карте отмечали открытую рамку считывания (ORF).

Пример 3. Картирование эпитопов антитела 16B5.

Идентификация эпитопа путем анализа пептидных фрагментов.

Последовательность тау человека с 4 повторами связывания с микротрубочками и без N-концевых вставок и содержащую мутацию P301L (гТау) экспрессировали в E.coli и очищали. Данная форма тау имела последовательность SEQ ID NO: 3 с заменой лейцина на пролин в положении 243 (которая соответствует P301L с применением системы нумерации на основе самой длинной изоформы тау). Ферментное расщепление 200 мкг тау проводили с одной из четырех различных протеаз: трипсином (который расщепляет по карбоксильным концам аргинина и лизина), химотрипсином (который, в первую очередь, расщепляет по карбоксильным концам тирозина, триптофана, фенилаланина и лейцина), LysC (который расщепляет по карбоксильным концам лизина) или GluC (который расщепляет после остатков глутамата



и редко после остатков аспартата). Все протеазы были получены от Thermo Scientific, а гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Полученные пептидные фрагменты инкубировали с 10 мкг 16B5 и осаждали при помощи магнитных шариков с белком G (NEB). Осадок тщательно промывали в ФСБ, содержащем 300 mM NaCl и 0,5% NP-40, затем элюировали 1 M NaCl в 100 mM глицине, pH 2,8. Элюаты сушили под вакуумом и ресуспендировали в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ). Ресуспендированные элюаты наносили на 4,6×50 мм колонку C18, затем фракционировали при помощи ВЭЖХ (Agilent 1260 Infinity system) с применением линейного градиента ацетонитрила с 0,075% ТФУ. Фракции пиков собирали, сушили и ресуспендировали в дистиллированной воде. Массы пептидов и идентичность определяли посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF. Пик, соответствующий остаткам 25-44 последовательности SEQ ID NO: 1, был идентифицирован в масс-спектре после LysC. Пики, соответствующие остаткам 25-44 последовательности SEQ ID NO: 1 и 24-44, были идентифицированы в масс-спектре после трипсина. Не было получено сигнала после расщепления химотрипсином и GluC, предполагается, что некоторые эпитопы могли содержать остаток 29 последовательности SEQ ID NO: 1 и/или остаток 37 последовательности SEQ ID NO: 1.

Идентификация эпитопа путем мутационного анализа.

Используя результаты, полученные путем анализа пептидных фрагментов (описанного выше), проводили делеционный мутагенез гТau путем амплификации всей плазмиды с применением стандартных методов молекулярной биологии. Белок экспрессировали в небольших объемах бактериальной культуры и равные объемы очищенного бактериального лизата подвергали электрофорезу, блоттингу и окрашиванию антителами 16B5. Для контроля нанесения образца применяли антитело Tau46 со специфичностью к С-концевой области тау (С-концевому эпитопу) для окрашивания дубликатов блотов. Оба антитела применяли в концентрации 0,2 мкг/мл. Изображения получали при помощи флуоресцентного сканера Licor Odyssey. Данным способом получали и анализировали следующие делеционные мутанты тау: Δ5-24, Δ23-32, Δ25-44, Δ30-39 и Δ37-46. Как показано на фиг. 1 и 2, делеционные мутанты тау Δ25-44 и Δ30-39 не обнаружены посредством антител 16B5, предоставляя доказательства того, что эпитоп, распознаваемый 16B5, лежит в пределах этих остатков. Делеционный мутант тау Δ37-46 лишь незначительно определялся посредством 16B5, предоставляя доказательства того, что некоторые из остатков в 37-46 (например, остаток 37) могут играть роль в связывании 16B5 с тау. Антитела 16B5 окрашивали делеционный мутант тау Δ23-32 в меньшей степени, чем Δ5-24, и в большей степени, чем делеционные мутанты Δ25-44 и Δ30-39, предоставляя доказательства того, что 16B5 также может связываться с пептидом, содержащим остатки 33-36, 30-36, 33-37, 30-37 или 33-39. В целом, данные, полученные от делеционных мутантов тау, позволяют предположить, что эпитоп, распознаваемый 16B5, может содержать некоторые или все остатки 23-32 последовательности SEQ ID NO: 1 и некоторые или все из остатков 37-46 последовательности SEQ ID NO: 1. Например, 16B5 может распознавать эпитоп в пределах остатков 32-38 или 28-41 последовательности SEQ ID NO: 1.

Идентификация эпитопа путем аланинового сканирования.

Одиночные остатки в области тау, охватывающие остатки 30-42, затем заменяли посредством мутации на аланин с помощью ПЦР мутагенеза. Мутантные белки экспрессировали, лизаты разделяли посредством электрофореза и блоттировали либо с антителом 16B5, либо антителом Tau46, как описано выше. Результаты данного анализа представлены на фиг. 3. Проанализированные конкретные точечные мутанты, включая T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L и G42A, перечислены наверху блотов. Остатки, представляющие особый интерес, обведены рамкой на каждом блоте. Обнаруживаемое связывание 16B5 полностью устранено мутантом тау Q33A и существенно уменьшено мутантом тау G37A, предоставляя доказательства того, что остаток 33, и в меньшей степени остаток 37, могут быть важными компонентами эпитопа, узнаваемого 16B5. Другие остатки могут быть важными компонентами эпитопа, узнаваемого 16B5 при Вiascog анализе.

Пример 4. Пассивная иммунизация в hTau.P301L трансгенной мышью модели таупатии.

Иммунизация.

В данном исследовании применяли 3-месячных самок мышей hTau.P301L-Tg с фоновым генотипом FVB/N. Введение 10 мг/кг тестируемых и контрольных антител проводили внутривенно один раз в неделю. Продолжительность обработки составила около 5 месяцев. После 23 инъекций исследование завершали умерщвлением мышей. В табл. 1 описаны тестируемые и контрольные антитела, которые вводили в данном исследовании.



Таблица 1

Схема дозирования

	Группа К	Группа М
Антитело	16B5	6F10
Специфичность связывания	В пределах 23-46 (см. пример 3)	Неиммунный контроль изотипа IgG1
N	22	22
Обработка	N2	N3
Доза	10 мг/кг еженедельно	10 мг/кг еженедельно
Объем дозы	1,724 мл/кг	2,381 мл/кг

В трансгенных мышиных моделях таупатии наблюдается преждевременная смерть как клиническое проявление генетического заболевания. В конкретный модели, применяемой в данном исследовании, гиперфосфорилированный тау образовывался в возрасте от 6 месяцев, хотя и с высокой изменчивостью возникновения. Мыши также страдали двигательными дефектами, такими как сдавливание задних конечностей (hind limb clasping) и снижение общей подвижности, и преждевременно умирали в возрасте 8-11 месяцев в (reMYND неопубликованные данные, Terwel et al., 2005). Мышей, у которых развивались симптомы терминальной стадии заболевания, характеризующиеся наличием клинического проявления сдавливания (clasping phenotype) и потерей массы, умерщвляли. Неожиданно большое количество мышей преждевременно погибли без присутствия данных симптомов. Причина смерти в таких случаях, как полагают, не имела отношения к поздней стадии таупатии или тестируемому антителу, а вместо этого, как полагают, была связана с инбредным фоновым генотипом FVB/N.

В табл. 2 представлен обзор общей выживаемости всех мышей в течение исследования.

Таблица 2

Выживаемость во время обработки (все причины смерти)

		Н в начале исследования	Н выживших перед умерщвлением	% выживаемости
Группа К	N2	22(23)*	11	50(47)
Группа М	N3	22	13	59

\* Одну мышь в группе К необходимо было заменить в начале исследования. Данные можно проанализировать с или без замененной мыши.

После умерщвления мышей препарировали и гомогенизировали ствол головного мозга и средний мозг с применением механического гомогенизатора поттер-типа (VOS 14 S40, частота 750 об/мин; VWR) в 10 объемах (на единицу массы) охлажденного на льду буфера трис-протеиназы-фосфатазы-ингибитора (TPPI-буфера), содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 8,1); 150 мМ NaCl; 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Merck); 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТА, Sigma-Aldrich); 5 мМ пирогосфата натрия (Sigma); 30 мМ фторида натрия (Sigma-Aldrich); 1 мМ ФМСФ (Sigma); 2 мМ ванадата натрия (Sigma); 10 мМ 1,10-орто-фенантролинмоногидрата (Sigma-Aldrich); 5 мкг/мл соевого ингибитора трипсина; 5 мкг/мл пепстатина и смесь ингибиторов протеаз (CPI, Рош Диагностика ГмбХ, Германия). Фиксированные объемы 140 и 100 мкл гомогенатов ствола головного мозга и среднего мозга (TotH), соответственно, (примерно половину от общего объема) центрифугировали при 136000×g в течение 60 мин при 4°C (ротор TLA-55, ультрацентрифуга OptimaTM TLX, Beckman Coulter) для получения трис-растворимой фракции (SF) и остатки общих гомогенатов хранили при -80°C. Из-за ограниченного числа держателей центрифуги (N=12) образцы рандомизировали для уравнивания центрифуги и разделяли на различные группы обработки в течение разных сеансов центрифугирования.

Супернатант (S1, также называемый "растворимой фракцией" или "SF") отделяли от осадка (P1), аликвотировали и хранили при -80°C. Осадок P1 солиubilizировали в 10 об. (на единицу массы) раствора с высоким содержанием соли (0,85 М NaCl, содержащего TPPI-буфер) и центрифугировали при 20000×g в течение 30 мин при 4°C. Полученный осадок (P2) с высоким содержанием соли хранили при -80°C. Супернатант (S2) переводили в 1% саркозил, используя одну десятую 10% саркозила, и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин во вращающемся шейкере-переворачивателе (top-over-top rotary tumbler), затем центрифугировали при 136000×g в течение 60 мин при 4°C. Супернатант (S3), растворимый в саркозиде, хранили при -80°C и осадок, нерастворимый в саркозиде (P3, также называемый "нерастворимой фракцией" или "IF") ресуспендировали в 30 мкл TPPI-буфера и аликвотировали. Общий гомогенат (TotH), трис-растворимые (SF) и нерастворимые в саркозиде (IF) фракции ствола головного мозга, полученные в соответствии с протоколом фракционирования, описанным выше, использовали для последующих анализов посредством электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга.

Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг.

Для применения обычной SDS-PAGE и вестерн-блоттинга образцы денатурировали и восстанавли-

вали путем инкубации при 95°C в течение 10 мин, затем разделяли в 7,5% Трис-НСI гелях (Criterion XT Precast Gel, 26-карманов, 15 мкл, 1,0 мм; Biorad). После сухого электропереноса (iBlot™ Invitrogen) на ПВДФ-мембраны (iBlot™ Gel Transfer Stacks, ПВДФ, стандартный размер, Invitrogen) мембраны промывали в 0,4% ПФА в течение 30 мин, а затем промывали в Трис-солевом буфере. Далее мембраны инкубировали в течение 1 ч в Трис-солевом буфере (TBS, pH 7,6), содержащем 5% (мас./об.) обезжиренного сухого молока и 0,1% (об./об.) твин-20. Блоты инкубировали с различными первичными антителами к тау в течение ночи, при рабочих концентрациях, представленных в табл. 3. После промывки и инкубации с анти-мышинными или анти-кроличими HRP-конъюгированными вторичными антителами (антитела козы к IgG мыши или антитела козы к IgG кролика, DAKO) блоты обрабатывали при помощи системы обнаружения ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, продукт 34096, Thermo Scientific). Изображения записывали в цифровом виде (VisionWorks Acquisition, UVP) с различным временем экспозиции, и для анализа блотов применяли специализированное программное обеспечение (VisionWorks Analysis, UVP). Для сравнения внутренний стандарт для геля запускали с аликвотами четырех фракций, нанесенных на каждый гель для сравнения. Первичные моноклональные антитела к тау, применяемые для обнаружения, включали AT100 (фосфо-тау, Thermo Scientific; разведение 1:250), AT8 (фосфо-тау, Thermo Scientific; разведение 1:500), HT7 (пан тау, Pierce; разведение 1:1000) и 1F5 (эпитоп, неизвестный для испытательной лаборатории, Neotope, разведение 3:500). Блоты повторно исследовали с антителами к ГАФД (Abcam 9485; разведении 1:2500) в качестве контроля нагрузки. Пан-тау антитела не являются специфичными для фосфо-тау.

Таблица 3  
Краткое описание антител, применяемых для биохимического анализа

mAb	Поставщик	Специфичность (человек)	Стоковая концентрация	Рабочая концентрация
AT100	Thermo Scientific	Фосфо-PHF-тау pSer212/Thr214	200 мкг/мл	0,8 мкг/мл
AT 8	Thermo Scientific	Фосфо-PHF-тау pSer202/Thr205	200 мкг/мл	0,4 мкг/мл
HT7	Pierce	между остатками 159 и 163	200 мкг/мл	0,2 мкг/мл
1F5*	Neotope	pS <sup>404</sup>	1 мг/мл	6 мкг/мл
ГАФД	Abcam	Человек	1 мг/мл	0,4 мкг/мл

\*Изотип IgG2b, гибридома JH131-1F5.4.1, лот № NB-0081.

Как показано на фиг. 4, статистически значимое уменьшение количества тау наблюдалось в нерастворимых в саркозие фракциях ствола головного мозга у животных, обработанных антителом 16B5, по сравнению с животными, обработанными контрольным антителом 6F10. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента,  $p < 0,05$ . Данное уменьшение наблюдалось для обоих фосфо-тау специфических антител (AT8, верхнее левое изображение; AT100, нижнее левое изображение; 1F5, верхнее правое изображение) и пан-тау антител (HT7, нижнее правое изображение). Вестерн-блоты общего гомогената также указывают на значительное уменьшение отношения фосфо-тау к общему тау у животных, обработанных 16B5, по сравнению с контрольными животными, обработанными антителами 6F10, при детектировании с помощью фосфо-специфических антител. Смотрите фиг. 5, левое изображение (на котором показан сигнал, обнаруженный посредством антитела к фосфо-тау AT8, разделенный на сигнал, обнаруженный посредством антитела пан-тау HT7). В противоположность этому, не было никаких существенных изменений в соотношении общего тау к уровням ГАФД в общих гомогенатах от животных, обработанных 16B5, по сравнению с контрольными животными, обработанными антителами 6F10. Смотрите фиг. 5, правое изображение (на котором показан сигнал, обнаруженный посредством антитела пан-тау HT7, разделенный на сигнал, обнаруженный посредством антитела ГАФД). Эти данные предоставляют доказательства того, что уровень фосфо-тау, но не общего тау, снижен в гомогенатах.

#### Гистологический анализ.

Иммуногистохимический анализ с применением антител к фосфо-тау проводили в субталамическом ядре, прилегающем к неопределенной зоне (STH/ZI), и в промежуточном ядре мозжечка, передней и задней части, прилегающей к боковому ядру мозжечка (IntA/P/LAT). Сагитальные вибротомные срезы (40 мкм) до использования хранили в ФСБ с 0,1% азида натрия при 4°C. Восемь срезов на мышь в области брегмы окрашивали при свободном плаванье с помощью моноклональных антител AT8, AT100 или 1F5. Срезы выбирали для окрашивания при помощи указанными антителами, как указано в табл. 4 ниже. Срезы от всех животных, выбранные для конкретного окрашивания, рандомизировали для окрашивания и количественно оценивали "вслепую".

Свободно плавающие срезы инкубировали в Netwells™. Затем срезы дважды промывали ФСБ и инкубировали в течение 20 мин в 1,5% перекиси водорода в ФСБ и метанола (1:1) для устранения активно-

сти эндогенной пероксидазы. После промывки срезов три раза в ФСБ, содержащем 0,1% Тритон X100 (ФСБТ), срезы блокировали в течение 30 мин в 10% фетальной телячьей сыворотке (FCS) в ФСБТ с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами AT8, AT100 (Thermo scientific), используя концентрации 0,4 и 0,05 мкг/мл, соответственно, в ФСБТ с 10% FCS. После промывки срезы инкубировали с вторичными антителами козы к антителам мыши, меченными пероксидазой (GAMPO) (DAKO, 1/500 в ФСБТ, 10% FCS), и сигнал получали с использованием 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид (ДАБ, 1 таблетка на 10 мл Трис-НСl с 3 мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 10 мл). Срезы докрашивали гематоксилином Майера, обезвоживали в пять этапов (50, 70, 95 и 2×100%) в этаноле и ксилоле (Merck Eurolab) и помещали в Дерех (среда для заливки Дерех, BDH Laboratory).

Таблица 4

Краткое описание антител, применяемых для иммуногистохимического анализа

mAb	Поставщик	Специфичность	Хозяин	Стоковая концентрация	Рабочая концентрация
AT8	Thermo Scientific	Человек	Мышь	200 мкг/мл	0,4 мкг/мл
AT100	Thermo Scientific	Человек	Мышь	200 мкг/мл	0,05 мкг/мл

Изображения получали при помощи микроскопа Olympus BX41, оснащенного камерой Color view II Olympus, и анализировали при помощи компьютера с применением программного обеспечения AnalySIS Five - Cell^D. Интенсивность света и настройки конденсора для микроскопа сохраняли постоянным в течение всего процесса получения изображения. Все полученные изображения подвергали одинаковым компьютерным обработкам, чтобы минимизировать предвзятое отношение исследователя. Пороговое представление яркости изображения срезов (density slice thresholding) равномерно применяли в течение всего анализа.

Область, представляющую интерес, как определено ниже, выбирали для автоматического количественного определения сигнала(ов) при окрашивании. Субталамическое ядро и неопределенная зона были очерчены ножкой мозга вентрально и белым веществом дорсально, соответственно, а также на основе различий в плотности клеток (сагиттальный разрез мозжечка, брегма 1,32-1,92). Промежуточное ядро мозжечка, передняя и задняя части, и боковое ядро мозжечка были очерчены белым веществом и изменением плотности клеток и третьим желудочком (сагиттальный разрез мозжечка, брегма 1,92-2,64 для LAT и 0,84-1,8 для IntA/P). Для каждого окрашивания 6 срезов головного мозга, содержащих STN/ZI, и 16 срезов, содержащих IntA/P/LAT, на мышь были включены в анализ.

Как показано на фиг. 6, количество фосфо-тау, обнаруженное в ядрах мозжечка и субталамической области животных, обработанных антителами 16B5, было значимо ниже по сравнению с количеством фосфо-тау, обнаруженном в тех же структурах у контрольных животных, обработанных антителами 6F10. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента,  $p < 0,05$ .

#### Пример 5. Гуманизация 16B5.

Анализ последовательности показал, что антитело 16B5 имеет каппа-вариабельный домен (Vk), имеющий последовательность SEQ ID NO: 16, которая принадлежит подгруппе мыши 1 по Кабату, и соответствует подгруппе человека 4 по Кабату. CDR по Кабату подчеркнуты. Вариабельный тяжелый домен (Vh) антитела 16B5 имеет последовательность SEQ ID NO: 10, которая принадлежит подгруппе мыши 2b по Кабату, и соответствует подгруппе человека 1 по Кабату (Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition; NIH Publication No. 91-3242). CDR по Кабату подчеркнуты.

Домен 16B5 Vk содержит 17-й остаток последовательности CDR-L1 (KSSQSLNLSRTRKNYLA, SEQ ID NO: 17), 7-й остаток последовательности CDR-L2 (WASTRES, SEQ ID NO: 18) и 8-й остаток последовательности CDR-L3 (KQSYTLRT, SEQ ID NO: 19). Последовательность CDR-L1 принадлежит к каноническому классу 3 и последовательности CDR-L2 и CDR-L3 принадлежат к каноническому классу 1 (Martin & Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263:800-15).

Домен 16B5 Vh содержит 5-й остаток последовательности CDR-H1 (YHGMD, SEQ ID NO: 11) на основе нумерации Кабата или 10-й остаток последовательности CDR-H1 (GYPFTYHGMD, SEQ ID NO: 24) на основе комбинированной нумерации Кабата и Чотиа, 17-й остаток последовательности CDR-H2 (WINTYSGVPTYADDFKG, SEQ ID NO: 12) и 8-й остаток последовательности CDR-H3 (RRDFTMDF, SEQ ID NO: 13). Последовательность CDR-H1 принадлежит к каноническому классу 1 и последовательность CDR-H2 принадлежит к каноническому классу 2 (Martin & Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263:800-15). Последовательность CDR-H3 не имеет канонического класса, но, вероятно, основания, создающие изломы (kinked base), в соответствии с правилами Shirai et al. (1999), FEBS Lett. 455:188-97.

Остатки в зоне контакта между доменами Vk и Vh представляют собой обычные остатки для данных позиций у мышей.

Проводили поиск среди белковых последовательностей в базе данных PDB (Deshpande et al. (2011), J. Virol. 85:1820-33), чтобы найти структуры, которые обеспечивали бы грубую структурную модель антитела 16B5. Структуру Fab-фрагмента антитела Te33 к холерному токсину (pdb код 1ZEA\_H) использовали для VL с разрешением 1,78 Å. Оно сохранило одинаковую каноническую структуру петель с 16B5. Кристаллическую структуру Fab в Dsbb-Fab комплексе (pdb код 2ZUQB) использовали для моделирова-

ния домена VH из 16B5. Его расшифровали с разрешением 3,3 Å и он содержал одинаковые канонические структуры для CDR-H1 и CDR-H2, а также имел одинаковую длину CDR-H3 с основаниями, создающими изломы. Программу BioLuminate применяли для моделирования грубой структуры 16B5 Fv.

Поиск по неизбыточной базе данных последовательностей белков из NCBI с CDR"X" 16B5 Fv последовательностью позволил выбрать подходящие каркасные участки человека, в которые встроили CDR мыши. Для Vk выбрана каппа легкая цепь человека с учетным номером ACJ71718.pro в NCBI (SEQ ID NO: 20). Данная последовательность человека каппа легкой цепи имеет те же канонические классы для CDR-L2 и L3. Для Vh выбран Ig тяжелой цепи BAC02002.1 человека (SEQ ID NO: 14). Он разделяет каноническую форму 16B5 CDR-H1 и H2, и H3 представляет собой 8 остатков в длину с прогнозируемыми основаниями, создающими изломы.

Конструкция гуманизированной тяжелой цепи и легкой цепи и обратные мутации на основе данных каркасных участков человека приведены в табл. 5 и 6, соответственно.

Разработана гуманизированная 16B5 переменная тяжелая цепь (H1), имеющая последовательность SEQ ID NO: 15. Конструкция включает три обратные мутации: R13K; V48M и Y98F. К в положении 13 выбран потому, что он чаще встречается, чем R у людей. М в положении 48 выбран потому, что он чаще встречается, чем V у людей. F в положении 98 выбран потому, что он расположен в зоне контакта, что делает его желательным для сохранения остатка мыши.

Разработаны три гуманизированные 16B5 переменные последовательности легкой цепи:

Версия 1 (L1) имеет последовательность SEQ ID NO: 21 и содержит три обратные мутации: D1N; M4L и Y36F. N в положении 1 выбран потому, что образует потенциальную водородную связь с N61 в HCDR2. L в положении 4 выбран потому, что контактирует с K96, Q97 и S98 в LCDR3; он также контактирует с F104, контактный остаток (interface residue). F в положении 36 выбран потому, что Y может образовывать водородную связь с D106 в HCDR3, в то время как F не может. Водородная связь могла бы создавать дополнительное взаимодействие, которое могло повлиять на функцию HCDR3, и таким образом ее предпочтительно избегать.

Версия 2 (L2) имеет последовательность SEQ ID NO: 22 и содержит четыре обратные мутации: D1N; M4L; Y36F и P43S. Обоснования для D1N, M4L и Y36F такие же, как для версии 1. S в положении 43 выбран потому, что S образует водородную связь с Q110 в VH, который близок к HCDR3.

Версия 3 (L3) имеет последовательность SEQ ID NO: 23 и содержит три обратные мутации: M4L; Y36F и P43S. Обоснования для каждой из этих мутаций такое же, как для версий 1 и 2.

Таблица 5

Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизированная конструкция v1 (R13K, V48M, Y98F) SEQ ID №:15
1	1	Fr1	Q	Q	Q
2	2	Fr1	I	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L
5	5	Fr1	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G
9	9	Fr1	P	S	S
10	10	Fr1	E	E	E
11	11	Fr1	L	L	L
12	12	Fr1	K	K	K
13	13	Fr1	K	R	K
14	14	Fr1	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G
16	16	Fr1	E	A	A
17	17	Fr1	T	S	S
18	18	Fr1	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K
20	20	Fr1	I	V	V
21	21	Fr1	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S

26	26	Fr1	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y
28	28	Fr1	P	S	T
29	29	Fr1	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T
31	31	CDR-H1	Y	S	Y
32	32	CDR-H1	H	Y	H
33	33	CDR-H1	G	A	G
34	34	CDR-H1	M	V	M
35	35	CDR-H1	D	N	D
35A		CDR-H1			
35B		CDR-H1			
36	36	Fr2	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q
40	40	Fr2	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P
42	42	Fr2	W	G	G
43	43	Fr2	G	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W
48	48	Fr2	M	V	M
49	49	Fr2	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I
52	52	CDR-H2	N	N	N
52A	53	CDR-H2	T	T	T
52B	54	CDR-H2	Y	N	Y
52C	55	CDR-H2	S	T	S
52D	56	CDR-H2	G	G	G
52E	57	CDR-H2	V	N	V
52F	58	CDR-H2	P	P	P
53	59	CDR-H2	T	T	T
54	60	CDR-H2	Y	Y	Y
55	61	CDR-H2	A	A	A
56	62	CDR-H2	D	Q	D
57	63	CDR-H2	D	G	D
58	64	CDR-H2	F	F	F
59	65	CDR-H2	K	T	K
60	66	CDR-H2	G	G	G
66	67	Fr3	R	R	R
67	68	Fr3	F	F	F
68	69	Fr3	A	V	V
69	70	Fr3	F	F	F
70	71	Fr3	S	S	S
71	72	Fr3	L	L	L
72	73	Fr3	E	D	D
73	74	Fr3	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S
75	76	Fr3	V	V	V
76	77	Fr3	G	S	S
77	78	Fr3	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A
79	83	Fr3	Y	Y	Y
80	84	Fr3	L	L	L
81	85	Fr3	Q	Q	Q
82	86	Fr3	I	I	I
82A	87	Fr3	N	S	S
82B	88	Fr3	N	S	S
82C	89	Fr3	L	L	L
83	90	Fr3	K	K	K

84	91	Fr3	N	A	A
85	92	Fr3	E	A	E
86	93	Fr3	D	D	D
87	94	Fr3	T	T	T
88	95	Fr3	A	A	A
89	96	Fr3	T	V	V
90	97	Fr3	Y	Y	Y
91	98	Fr3	F	Y	F
92	99	Fr3	C	C	C
93	100	Fr3	A	A	A
94	101	Fr3	R	R	R
95	102	CDR-H3	R	A	R
96	103	CDR-H3	R	R	R
97	104	CDR-H3	D	G	D
98	105	CDR-H3	F	Q	F
99	106	CDR-H3	T	N	T
100	107	CDR-H3	M	G	M
100A		CDR-H3		M	
100B					
100C					
100D					
100E					
100F					
100G					
100H					
100I					
100J					
100K					
101	108	CDR-H3	D	D	D
102	109	CDR-H3	F	V	F
103	110	Fr4	W	W	W
104	111	Fr4	G	G	G
105	112	Fr4	Q	Q	Q
106	113	Fr4	G	G	G
107	114	Fr4	T	T	T
108	115	Fr4	S	T	T
109	116	Fr4	V	V	V
110	117	Fr4	T	T	T
111	118	Fr4	V	V	V
112	119	Fr4	S	S	S
113	120	Fr4	S	S	S

Таблица 6

Последовательности для гуманизации переменных областей легкой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело SEQ ID №:16 мыши	Hu VL акцептор FR SEQ ID №:20	Гуманизированная конструкция v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID №:21	Гуманизированная конструкция v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID №:22	Гуманизированная конструкция v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID №:23
1	1	Fr1	N	D	N	N	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	D	D	D
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S

Таблица 5

## Последовательности для гуманизации тяжелой цепи 16B5

Остаток по Кабату №	Линейный остаток №	FR или CDR	Родительское моноклональное антитело мыши SEQ ID №:10	Hu VH акцептор FR B2 SEQ ID №:14	Гуманизованная конструкция v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID №:15
15	15	Fr1	P	L	L
16	16	Fr1	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	R
19	19	Fr1	V	A	A
20	20	Fr1	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	I
22	22	Fr1	S	N	N
23	23	Fr1	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L
27D	31	CDR-L1	N	Y	N
27E	32	CDR-L1	S	S	S
27F	33	CDR-L1	R	S	R
28	34	CDR-L1	T	N	T
29	35	CDR-L1	R	N	R
30	36	CDR-L1	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W
36	42	Fr2	F	Y	F
37	43	Fr2	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P

035943

41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	P	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	I	I	I	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D	D
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	V	L	L	L	L
79	85	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	K	Q	K	K	K
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	S	Y	S	S	S
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	T	S	T	T	T
94	100	CDR-L3	L	T	L	L	L
95		CDR-L3		P			
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	101	CDR-L3	R	Q	R	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F



99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	N	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R	R	R	R	R

Пример 6. Аффинность гуманизированных антител 16B5 к тау.

Данные по связыванию для гуманизированных антител 16B5, имеющих конструкцию H1L1 или H1L2, приведены ниже в табл. 7. Для сравнения также показаны данные по связыванию для химерного 16B5. Данные получены с использованием прибора Biacore. Авторы сделали вывод, что версия H1L2 имела наиболее сильную аффинность - по существу такую же, что и химерное 16B5. Гуманизированные 16B5 версии H1L1 и H1L3 также имели достаточную аффинность.

Измерения поверхностного плазмонного резонанса проводили с использованием Biacore T200 (GE Lifesciences). Все эксперименты проводили с применением подвижной фазы 10 мМ ГЭПЭС pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,05% твин-20 при 30 мкл/мин на сенсорном чипе CM5, подготовленном посредством аминного присоединения захватывающего антитела к антителам мыши или человека. Антитело 16B5 (химерная или гуманизированная форма) связывалось с иммобилизованным захватывающим антителом и различные концентрации рекомбинантного очищенного hTau-P301L применяли к комплексу антитела при последовательных итерациях. Итерационные стадии разделяли стадиями регенерации с высоким содержанием соли или низким pH. Данные эксперименты повторяли с различными составами антитела и антигена. Анализ проводили со встроенным программным обеспечением Biacore.

Таблица 7

Данные Biacore

	K <sub>D</sub> (М)	K <sub>on</sub> (1/Мс)	K <sub>on</sub> ошибка	K <sub>off</sub> (1/с)	K <sub>off</sub> ошибка
<b>Chi16B5</b>	232 пМ	1,43 × 10 <sup>7</sup>	1,5 × 10 <sup>5</sup>	3,33 × 10 <sup>-3</sup>	3,5 × 10 <sup>-5</sup>
<b>Hu16B5H1L1</b>	617 пМ	3,5 × 10 <sup>6</sup>	1,5 × 10 <sup>4</sup>	2,15 × 10 <sup>-3</sup>	8,2 × 10 <sup>-6</sup>
<b>Hu16B5H1L2</b>	286 пМ	1,2 × 10 <sup>7</sup>	4,6 × 10 <sup>4</sup>	3,42 × 10 <sup>-3</sup>	1,1 × 10 <sup>-5</sup>
<b>Hu16B5H1L3</b>	320 пМ	1,25 × 10 <sup>7</sup>	6,2 × 10 <sup>4</sup>	3,98 × 10 <sup>-3</sup>	1,8 × 10 <sup>-5</sup>

Пример 7. Обнаружение тау путем иммунопреципитации с помощью гуманизированных антител 16B5.

Посмертный образец лобной коры пациента с болезнью Альцгеймера с баллами Браака, составлявшими 6, последовательно экстрагировали в буферах с увеличивающейся силой солиubilизации в следующем порядке: (I) буфер с высоким содержанием соли (20 мМ Трис, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% сахарозы, 7500 мМ NaCl, pH 7,4); (II) тритон-буфер (20 мМ Трис, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% сахарозы, 1% Тритон X100, 500 мМ NaCl, pH 7,4) и (III) буфер саркозила (10 мМ Трис, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10% сахарозы, 500 мМ NaCl, 1% саркозила, pH 7,4).

Для каждого образца 200 мкг фракции, растворимой при высоком содержании соли, или 20 мкг фракции, нерастворимой в саркозила, разбавляли в 400 мкл буфера для иммунопреципитации (10 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,5% Тритон X100, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4). Образцы предварительно очищали при помощи магнитных шариков с белком G (New England Biolabs) и в каждую пробирку добавляли 5 мкг антитела. Применяемые антитела включали: 1) неиммунное антитело IgG мыши (mIgG) в качестве контроля; 2) неиммунное антитело IgG человека (hIgG) в качестве контроля; 3) химерное антитело 16B5 (Chi16B5); 4) гуманизированное 16B5, версия H1L2 (h16B6-H1L2) и гуманизированное 16B5, версия H1L3 (h16B6-H1L3). Предварительно очищенные лизаты и антитела инкубировали в течение 2 ч при 4°C. Антитело/антигенные комплексы осаждали при помощи магнитных шариков с белком G и осадок тщательно промывали ФСБ/350 мМ NaCl. После элюирования с использованием буфера Лэммли элюаты разделяли посредством ДСН-ПААГ и блоттировали с применением поликлональных антител к тау (DAKO).

Как показано на фиг. 7, химерное 16B5 и гуманизированные 16B5 H1L2 и H1L3 распознавали тау в обеих растворимых и нерастворимых фракциях из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

Пример 8. Иммуногистохимическое определение характеристик и гуманизированных антител 16B5 мыши к тау на мозге при болезни Альцгеймера.

Моноклональное антитело 16B5 мыши к тау и два гуманизированных варианта, h16B5-H1L2 и h16B5-N1D, также протестировали иммуногистохимически на свежемороженых срезах коры головного мозга человека от доноров с болезнью Альцгеймера и не больных данным заболеванием определенного возраста.

### Способы

Ткани головного мозга человека.

Лобную кору получали из научно-исследовательского института здравоохранения Sun Health Research Institute. Случаи включали шесть пациентов (средний возраст  $86,8 \pm 0,40$  СКО) с диагнозом болезни Альцгеймера и с подтверждением путем нейропатологической оценки при вскрытии, и трех пациентов не больных данным заболеванием определенного возраста (средний возраст  $77 \pm 9,7$  СКО). Демографические данные для этих случаев приведены ниже в табл. 8. Иммуногистохимию проводили на слегка зафиксированных в ацетоне 10-мкм криосрезах на предметном стекле.

Таблица 8  
Демографические данные для случаев, тестируемых иммуногистохимически

Случай	Диагноз	Возраст (лет)	Пол	Интервал посмертного вскрытия (ч)
11-21	Болезнь Альцгеймера	88	Ж	2,28
03-34	Болезнь Альцгеймера	88	Ж	3,3
08-06	Болезнь Альцгеймера	86	М	2,66
03-52	Болезнь Альцгеймера	86	М	2,2
01-16	Болезнь Альцгеймера	87	М	3
01-18	Болезнь Альцгеймера	86	М	3
10-63	Контроль	79	М	3
10-39	Контроль	93	М	3
10-22	Контроль	59	Ж	3,2

Иммуногистохимия.

Иммунопероксидазный метод являлся главной системой обнаружения, которая состояла из любого полимера, меченого пероксидазой, конъюгированного с антителом козы к иммуноглобулинам мыши (EnVision+System HRP labeled Polymer; Dako K4001), или амплификационной системы Vector ABC для непосредственно биотинилированных гуманизованных антител (ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories). Окрашивание визуализировали с хромогеном ДАБ (Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako K3468), который образовывал коричневый осадок.

Отрицательный контроль состоял из выполнения всей иммуногистохимической процедуры на близлежащих срезах при помощи антитела контрольного изотипа IgG или в отсутствие первичного антитела.

Иммунофлуоресцентное мечение.

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание проводили для определения взаимосвязи между мышинным и гуманизованными вариантами антител, другими антителами к тау, которые распознают различные фосфорилированные эпитопы и бета-амилоид. Срезы ткани окрашивали параллельно смесью антител, содержащей биотинилированные или FITC-меченые гуманизованные варианты 16B5 (1 мкг/мл) и антитела мыши (или моноклональные 16B5 (1 мкг/мл), AT8 (1:1000), AT100 (1:1000) или 3D6 (1 мкг/мл).

Антитела мыши определяли при помощи вторичных антител козы к антителам мыши, конъюгированным с флуорофором 488 или 635 (Invitrogen). Биотинилированные гуманизованные антитела определяли стрептавидином 635.

Предварительная абсорбция.

Для оценки специфичности антител к антигенам-мишеням 1 мкг/мл антител 16B5 предварительно абсорбировали с 50 мкг/мл очищенного P301L тау человека или синуклеина дикого типа (посторонний белок) в течение ночи при 4°C. Затем антитела наносили на ткань и проводили иммуногистохимическую процедуру, как описано выше.

Визуальный анализ.

Стекла исследовали или с помощью микроскопа Olympus BX61, Olympus Nanozoomer 2.0HT, или спектральной конфокальной системы Leica SPE. Изображения получали в виде TIFF файлов.

Результаты.

Как показано ниже в табл. 9, моноклональные антитела 16B5 мыши и оба гуманизованные варианта показали реакционную способность с тканью при болезни Альцгеймера, при окрашивании заметны нити нейропиля, несколько нейрофибриллярных клубков (большой частью шаровидных) и несколько тау-положительных нейритических бляшек. Большая часть 16B5 AD-фибриллярной патологии ограничивалась серым веществом, но также обнаружена некоторая реакционная способность в белом веществе. В отличие от этого, контрольная ткань без наличия болезни показала диффузную фоновую реакционную

способность, но была отрицательной на наличие для любых патологий, обнаруженных в ткани при болезни Альцгеймера.

Эксперименты с двойным мечением проводили с моноклональной версией антитела мыши 16B5 и (1) и гуманизированными вариантами, (2) антителами, распознающими тау в различных фосфорилированных эпитопах, и (3) бета-амилоид, для дальнейшей характеристики патологий, распознаваемых вариантами антител.

И h16B5-H1L2 и h16B5-N1D совместно локализуются с моноклональным антителом 16B5 с высокой конгруэнтностью на AD-фибриллярных патологических структурах. H16B5-H1L2 также обнаруживали патологии, которые демонстрировали иммунореактивность на различных фосфорилированных эпитопах тау, включая серин202 и треонин205 (AT8), серин212 и треонин214 (AT100) и серин396 (антитело собственной разработки (in-house proprietary antibody), 20H1). Наконец, двойное мечение посредством антитела к бета-амилоиду, которое распознает N-концевую аминокислотную последовательность (3D6; aa 1-5), и антитела 16B5 показало очень небольшую совместную локализацию между A $\beta$  и 16B5-иммунореактивными структурами на амилоидных бляшках.

Когда иммунореактивность 16B5 сравнивали с хорошо охарактеризованным коммерчески доступными моноклональным антителом к тау (Dako), то оба окрашивали AD-фибриллярную патологию, которая включала тау-положительные нейритические бляшки, нити нейропиля и нейрофибриллярные клубки.

Специфичность антитела оценивали путем предварительной абсорбции с очищенным рекомбинантным тау P301L. Уменьшение окрашивания наблюдали, когда 16B5 предварительно абсорбировали с тау P301L, но на окрашивание не было влияния, если антитела предварительно абсорбировали с посторонним белком (синуклеином дикого типа) в той же молярной концентрации.

Срезы с отсутствием контрольных антител IgG-изотипа и первичных антител имели отрицательное окрашивание во всех тестируемых тканях.

Таблица 9

## Иммуногистохимическая характеристика антител 16B5

Антитело	Лот. №	Окрашивание ткани при болезни Альцгеймера (AD)	Концентрация
16B5 мыши	NB-0174A	Да	1 мкг/мл
Химерное 16B5	061512	Да	1 мкг/мл
h16B5-H1L2	NB-0248	Да	1 мкг/мл
H16B5-N1D	011113	Да	1 мкг/мл

Все публикации (включая учетные номера GenBank, учетные номера UniProtKB/Swiss-Prot и т.п.), патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент и заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. В случае любых отклонений в последовательностях, связанных с учетными номерами Genbank и UniProtKB/Swiss-Prot и тому подобное, заявка ссылается на последовательности, связанные с цитируемыми учетными номерами, как действительная дата подачи заявки означает фактическую дату подачи или более раннюю дату приоритетной заявки, раскрывающую соответствующий учетный номер. Любую особенность, стадию, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в сочетании с любыми другими, если специально не указано иное. Несмотря на то что настоящее изобретение довольно подробно описано посредством иллюстраций и примеров в целях обеспечения ясности и понимания, будет очевидно, что можно осуществлять некоторые изменения и модификации в рамках прилагаемых пунктов формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, которое связывается с тау-белком человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15, и указанная переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 22.

3. Антитело по п.1, в котором по меньшей мере одна из позиций H13, H48 и H91 занята К, М и F, соответственно, и по меньшей мере одна из позиций L1, L4, L36 и L43 занята N, L, F и S, соответственно.

4. Антитело по п.2, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты К, М и F, соответственно, и по

меньшей мере две из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

5. Антитело по п.4, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты K, M и F, соответственно, и по меньшей мере три из позиций L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

6. Антитело по п.4, в котором позиции H13, H48 и H91 заняты K, M и F, соответственно, и позиции L1, L4, L36 и L43 заняты N, L, F и S, соответственно.

7. Антитело по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 22.

8. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 15 и указанная переменная область легкой цепи по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 22.

9. Антитело по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи соединена с константной областью тяжелой цепи, представляющей собой мутантную форму константной области природного антитела человека, связывание которой с рецептором Fcγ ослаблено по сравнению с константной областью природного антитела человека.

10. Антитело по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи соединена с константной областью тяжелой цепи, которая принадлежит изотипу IgG1.

11. Антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 25, и указанная переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 21, 22 или 23.

12. Антитело по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 25, и указанная переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 22.

13. Антитело по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

14. Антитело по любому из пп.1-8 или 10-13, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи соединена с константным доменом IgG1 человека, имеющим последовательность SEQ ID NO: 29 с лизинем на C-конце или без лизина на C-конце.

15. Антитело по любому из пп.1-14, отличающееся тем, что указанная переменная область легкой цепи соединена с константной областью каппа антитела человека, имеющей последовательность SEQ ID NO: 32.

16. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, которое ассоциировано с тау-белком, содержащая антитело по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ лечения или профилактики болезни Альцгеймера, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп.1-15 пациенту, имеющему болезнь Альцгеймера, или пациенту с риском развития болезни Альцгеймера.

18. Способ лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с тау-белком, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп.1-15 пациенту, имеющему указанное заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

20. Способ уменьшения аберрантного переноса тау-белка, включающий введение эффективного количества антитела согласно любому из пп.1-15 пациенту, имеющему заболевание, ассоциированное с аберрантным переносом тау-белка, или имеющему риск развития указанного заболевания.

21. Способ индукции фагоцитоза тау-белка, включающий введение эффективного количества антитела согласно любому из пп.1-15 пациенту, имеющему ассоциированное с накоплением тау заболевание или имеющему риск развития указанного заболевания.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

23. Способ ингибирования агрегации или отложения тау-белка, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп.1-15 пациенту, имеющему заболевание, ассоциированное с агрегацией или отложением тау-белка, или имеющему риск развития указанного заболевания.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

25. Способ ингибирования образования клубков тау-белка, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп.1-15 пациенту, имеющему заболевание, ассоциированное с образованием клубков тау-белка, или имеющему риск развития указанного заболевания.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой неврологическое заболевание.

27. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи антитела по любому из пп.1-15.

28. Нуклеиновая кислота по п.27, содержащая сегмент, кодирующий тяжелую цепь, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25.

29. Нуклеиновая кислота по п.27 или 28, дополнительно содержащая сегмент, кодирующий константную область IgG1.

30. Нуклеиновая кислота по п.29, отличающаяся тем, что указанная константная область IgG1 представляет собой константную область IgG1 человека.

31. Нуклеиновая кислота по п.30, отличающаяся тем, что указанная константная область IgG1 имеет последовательность SEQ ID NO: 29 с лизином на С-конце или без лизина на С-конце.

32. Нуклеиновая кислота по п.31, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 30.

33. Нуклеиновая кислота по любому из пп.29-32, дополнительно содержащая интрон, соединяющий сегменты, кодирующие переменную область тяжелой цепи и константную область IgG1.

34. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область IgG1, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31.

35. Нуклеиновая кислота по п.34, содержащая сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.

36. Нуклеиновая кислота по п.35, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, имеет последовательность SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

37. Нуклеиновая кислота по п.35 или 36, дополнительно содержащая сегмент, кодирующий константную область каппа.

38. Нуклеиновая кислота по п.37, отличающаяся тем, что указанная константная область каппа представляет собой константную область каппа антитела человека.

39. Нуклеиновая кислота по п.38, отличающаяся тем, что указанная константная область каппа имеет последовательность SEQ ID NO: 32.

40. Нуклеиновая кислота по п.39, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область каппа, имеет последовательность SEQ ID NO: 33.

41. Нуклеиновая кислота по любому из пп.37-40, дополнительно содержащая интрон, который соединяет сегмент, кодирующий переменную область легкой цепи, с сегментом, кодирующим указанную константную область каппа.

42. Нуклеиновая кислота по п.41, отличающаяся тем, что указанный сегмент, кодирующий константную область каппа, имеет последовательность SEQ ID NO: 34.

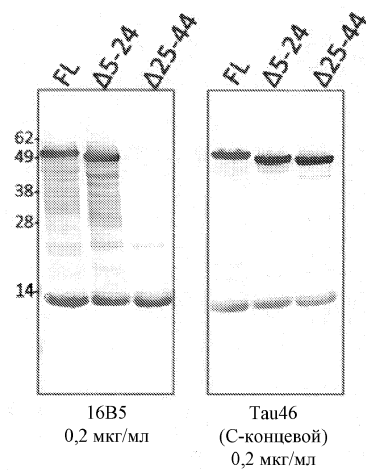
43. Нуклеиновая кислота по п.27, кодирующая переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 21, 22 или 23.

44. Химерное антитело, которое связывается с тау-белком человека и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

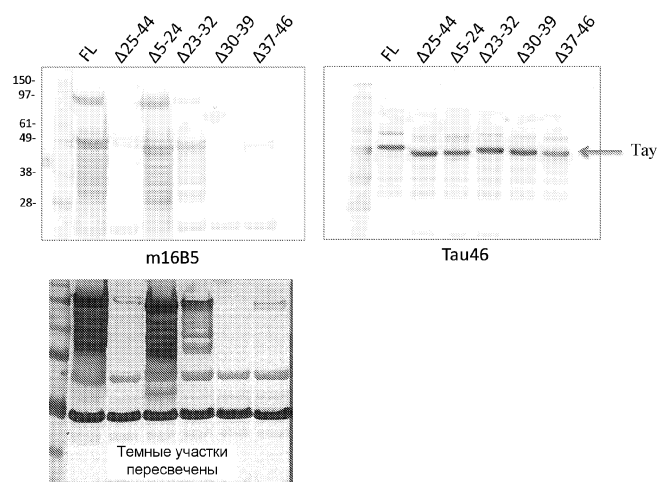
45. Венированное антитело, которое связывается с тау-белком человека и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 24, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 12 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 17, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

46. Антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-15.

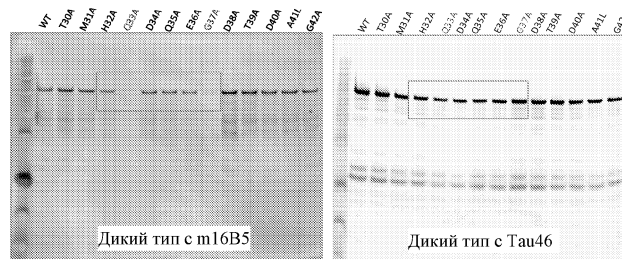
47. Антиген-связывающий фрагмент по п.46, который представляет собой Fab фрагмент.



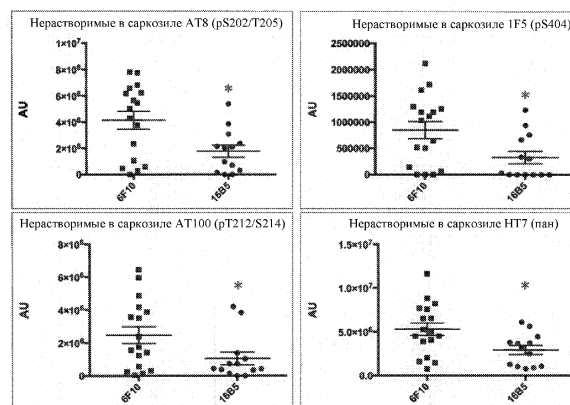
Фиг. 1



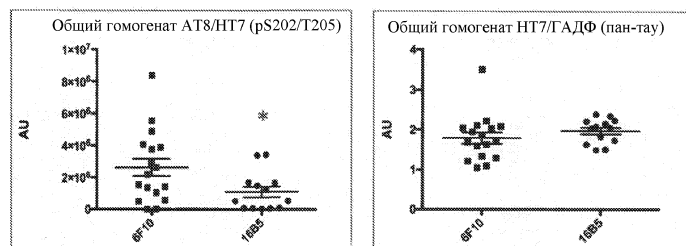
Фиг. 2



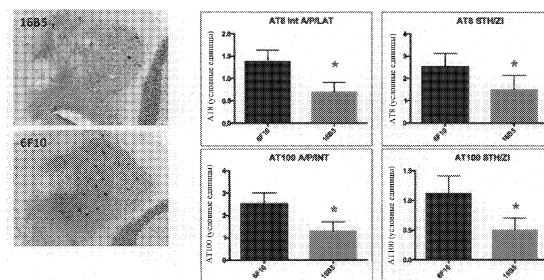
Фиг. 3



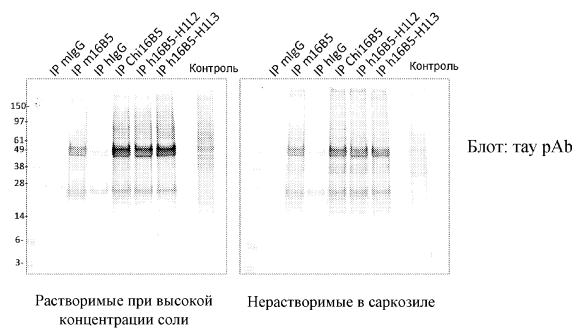
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

