



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123862** (13) **C2**  
(51) МПК (2021.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/18** (2006.01)**G01N 33/68** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)**A61K 49/00****A61K 39/00**НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2018 00762</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці): <b>Х. ЛУННБЕК А/С,</b> Ottiliavej 9, 2500 Valby, Denmark (DK)
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>12.07.2016</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>17.06.2021</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012045882 A1, 12.04.2012 WO 2013050567 A1, 11.04.2013 JOELLE ROSSEELS et al. Tau monoclonal antibody generation based on humanized yeast models / Joëlle Rosseels, Jeff Van den Brande, Marie Violet, Dirk Jacobs, Pierre Grognet, Juan Lopez, Isabelle Huvent, Marina Caldara, Erwin Swinnen, Anthony Papegaey, Raphaëlle Caillierez, Valerie Buée-Scherrer, Sebastiaan Engelborghs, Guy Lippens, Morvane Colin, Luc Buée, Marie-Christine Galas, Eugeen Vanmechelen, Joris Winderickx // Journal of biological chemistry, 24.12.2014. - Vol. 290. - no. 7. - P. 4059-4074 Anonymous: Mouse anti-Phospho-Tau 396 Mouse anti-Phospho-Tau 396; Catalog No. 35-5300, invitrogen cataologue catalog no. 35-5300, 1 October 2008 (2008-10-01), Retrieved from the Internet: URL: <a href="https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/35-5300_Mouse_anti-Phospho-Tau_396_Rev_1008.pdf">https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/35-5300_Mouse_anti-Phospho-Tau_396_Rev_1008.pdf</a> [retrieved on 15.01.2021] Anonymous: Product datasheet Anti-Tau (phospho S396) Ab [EPR2731] ab109390, abcam product catalogue, January 2014 (2014-01-01), Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.abcam.com/Tau-phospho-S396-Ab-EPR2731-ab109390.pdf">http://www.abcam.com/Tau-phospho-S396-Ab-EPR2731-ab109390.pdf</a> [retrieved on 15.01.2021]
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>1512211.2, 1518375.9</b>	
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13.07.2015, 16.10.2015</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>GB, GB</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.07.2018, Бюл.№ 13</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>16.06.2021, Бюл.№ 24</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/EP2016/066470, 12.07.2016</b>	
<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Педерсен Ян Торлеїф (DK), Педерсен Ларс Естергор (DK), Дехзель Юстус Клаус Альфред (DE), Абдур-Рашид Асуні Айодеджі (DK), Росенквіст Ніна (SE)</b>	

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, СПЕЦИФІЧНЕ ДО ГІПЕРФОСФОРИЛОВАНОГО ТАУ-БІЛКА, І СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

UA 123862 C2

---

**(57)** Реферат:

Винахід стосується моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з фосфорилованим сериновим залишком 396 в патологічному гіперфосфорилованому (PHF) тау-білку (pS396), а також до застосування цієї молекули і її тау-зв'язувального фрагменту в лікуванні хвороби Альцгеймера і таупатій.

Даний винахід відноситься до нового класу моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з фосфорилованим сериновим залишком 396 в патологічно гіперфосфорилованому (PHF) тау-білку (pS396), а також до способів застосування цих молекул і їх тау-зв'язувальних фрагментів в лікуванні хвороби Альцгеймера і таупатії.

5 Посилання на перелік послідовностей

Ця заявка містить один або декілька переліків послідовностей згідно з параграфами 1.821 і наступними розділу 37 CFR, які розкриті на машинопрочитуваних носіях (назва файлу: 0995.txt, створений 23 червня 2016 року і має розмір 40 кБ), при цьому даний файл включений в даний опис шляхом посилання у його повному обсязі.

10 Рівень техніки

Вікові нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD) і деменція, в даний час є однією з найбільших суспільних проблем. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я вартість лікування осіб старшого віку продовжуватиме підвищуватися, і кількість діагностованих випадків деменції потроїться до 2050 року (World Health Organization and Alzheimer's Disease International-Status Report (2012) DEMENTIA: A public health priority, WHO). Першими засобами лікування AD були модулятори вивільнення нейромедіаторів, такі як інгібітори ацетилхолінестерази, і модулятори NMDA-рецепторів. Ці терапевтичні засоби стали доступними на рубежі тисячоліть і як і раніше утворюють основу полегшення симптомів дефіцитів пам'яті, пов'язаних з деменцією і AD. Проте, ці лікарські засоби не впливають

20 цілеспрямовано на першопричини AD - накопичення агрегатів  $\beta$ -амілоїдного (A $\beta$ ) пептиду і тау-білка і асоційовану з ним втрату нейронних синапсів і нарешті нейронів.

Довгострокові широкомасштабні дослідження осіб старшого віку (Weiner, M.W. et al. (2014) ADNI online: <http://www.adni-info.org/>; Breteler, M.M. et al. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 23-28; Launer, L.J. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 2-13) разом з крупними повногеномними дослідженнями асоціацій (Lambert, J.C. et al. (2013) Nat. Genet. 45, 1452-1458) показали, що AD є неоднорідною комбінацією форм деменції, де до 10 відсотків пацієнтів із запущеною формою AD не мають патології амілоїдного пептиду (Crary, J.F. et al. (2014) Acta Neuropathol. 128, 755-766). Додатково, фундаментальні патологоанатомічні дослідження, проведені Braak & Braak (Braak, H. and Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12), продемонстрували чітку

30 кореляцію між ступенем патології нейрофібрилярних клубків і когнітивним статусом перед розтином. Ці спостереження підкріплювалися декількома дослідниками (Nelson, P.T. et al. (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381) і в недавніх довгострокових дослідженнях біомаркерів, які указують на те, що рівні тау-білка і фосфорилизованого тау-білка в цереброспінальній рідині (CSF) підвищуються впродовж ранніх і пізніх стадій захворювання (Jack, C.R., Jr. et al. (2013) Lancet Neurol. 12, 207-216).

Як вказано вище, тау-білок, асоційований з мікротрубочками, і його гіперфосфорилований варіант утворюють основну складову внутріклітинних нейрофібрилярних клубків, які є однією з головних характерних особливостей AD. Додатково, певні варіанти гена тау-білка асоційовані з сімейними формами лобно-скроневий деменції (FTD). Поява патології тау-білка при AD відбувається відповідно до чітко вираженого просторового патерну, починаючи з енторинальної кори з подальшим переходом в гіпокампульні зони і зони кори (Braak, H. and Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12). Конкретна стадія патології тау-білка також добре корелює з когнітивними здібностями (Nelson, P.T. et al. (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381; Braak, E. et al. (1999) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 249 Suppl 3, 14-22). Узяті разом, ці дані складають основу гіпотези, що спирається на те, що тау-білок грає певну роль в AD. Вона має на увазі, що внутріклітинне накопичення тау-білка приводить до руйнування мікротрубочок і колапсу дендритних шипиків. В результаті цього порушується комунікація між нейронами і настає загибель клітин. Недавно також було показано, що тау-білок сам по собі може утворювати ендопатогенні молекули, які можуть сприяти розповсюдженню нейродегенерації від однієї клітини до наступної (Clavaguera, F. et al. (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913).

50 I. Тау-білок як ендопатоген

Clavaguera і співавтори продемонстрували, що тау-білок сам по собі може діяти як ендопатоген (Clavaguera, F. et al. (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913). Екстракти головного мозку, отримувані при низькій швидкості центрифугування, виділяли з трансгенних по тау-білку мишей P301S (Allen, B. et al. (2002) J. Neurosci. 22, 9340-9351), розбавляли і ін'єктували в гіпокамп і зони кори молодих мишей ALZ17. Миші ALZ17 є трансгенною по тау-білку лінією мишей, у яких розвивається тільки пізня патологія (Probst, A. et al. (2000) Acta Neuropathol. 99, 469-481). У підданих ін'єкції мишей ALZ17 швидко розвивалася патологія щільних філаментів, і введення імуновиснажених екстрактів головного мозку від мишей P301S або екстрактів від мишей дикого типу не індукувало патологію тау-білка. Фракціонування екстрактів головного мозку на

розчинний (S1) і нерозчинний в саркозилі (P3) тау-білок (Sahara, N. et al. (2013) *J. Alzheimer's. Dis.* 33, 249-263) і їх ін'єкція мишам ALZ17 продемонстрували, що фракція P3 найбільшою мірою здатна індукувати патологію. Вона містить велику частину внутріклітинного гіперфосфорилизованого філаментозного тау-білка. Патологію в більшості випадків також можна було індукувати при ін'єкції екстрактів P301S в головний мозок мишей дикого типу, але NFT не утворювалися. У подальших дослідженнях Clavaguera і співавтори показали, що людський тау-білок, екстрагований посмертно з тканини головного мозку з іншими таупатіями (хворобою аргірофільних зерен (AGD), прогресуючим над'ядерним паралічем (PSP) і кортикобазальною дегенерацією (CBD)), також може індукувати патологію тау-білка в моделі ALZ17 (Clavaguera, F. et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9535-9540). З моменту представлення цих даних повідомлялося про деякі інші моделі затравлювальної дії і рознесення тау-білка (Ahmed, Z. et al. (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 667-683; Walker, L.C. et al. (2013) *JAMA Neurol.* 70, 304-310). Основний висновок цих досліджень вказує на механізм, за допомогою якого патогенний тау-білок у внутріклітинних включеннях секретується з клітини в периплазматичний простір. Матеріал патологічного тау-білка потім транспортується по оболонці синаптичних пухирців як в антероградному, так і в ретроградному напрямі і згодом поглинається сусідніми клітинами шляхом об'ємного ендоцитозу. Цей механізм пояснює, чому рознесення патології, спостережуване при захворюванні у людини, слідує чітко вираженому анатомічному патерну. Вельми цікаво, що периферичне введення патологічного тау-білка може прискорювати формування патології тау-білка у мишей ALZ17 (Clavaguera, F. et al. (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 299-301). Цей механізм рознесення може пояснювати розповсюдження захворювання при інших протеїнопатіях (Goedert, M. et al. (2010) *Trends Neurosci.* 33, 317-325; Sigurdsson, E.M. et al. (2002) *Trends Mol. Med.* 8, 411-413).

## II. Молекули тау-білка

Виявлення того, що тау-білок може діяти як ендопатоген, спонукало до пошуку "патогенних молекул", на які можна було б цілеспрямовано впливати в рамках потенційних методів інтервенційної терапії.

Ген тау-білка, що асоціюється з мікротрубочками (MAPT), розташований в хромосомі 17 людського генома і експресує шість ізоформ тау-білка в головному мозку дорослої людини. Ці ізоформи утворюються в результаті альтернативного сплайсингу екзонів 2, 3 і 10 з 16 екзонів в гені MAPT. Екзони 2 і 3 експресують повтор з 29 амінокислот, а екзон 10 експресує додатковий домен, що зв'язується з мікротрубочками. В результаті цього ізоформи тау-білка міститимуть 0, 1 або 2 N-кінцеві повтори і 3 або 4 C-кінцеві домени, що зв'язуються з мікротрубочками (тау-білок 3R або 4R). Зазвичай експресуються шість ізоформ тау-білка. Найбільш довга (2N4R) і найбільш коротка (0N3R) ізоформи складаються з 441 і 352 амінокислот, відповідно (Kolařova, M. et al. (2012) *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 731526). N-кінцевий виступаючий домен тау-білка (2N4R) складається з багатого гліцином "хвоста" з 44 амінокислот і залишків 45-102, що охоплюють дві висококіслі ділянки (N1, N2-домени). У залишках 151-243 виявлено дві ділянки, багаті проліном (P1, P2-домени). Решту білка складають чотири домени, що зв'язуються з мікротрубочками (R1-R4), за якими розташована коротка C-кінцева ділянка.

Тау-білок є вельми розчинним і високолабільним стосовно фосфорилювання білком. Приблизно 20 відсотків, або 85, амінокислотних залишків в найбільш довгій ізоформі тау-білка є потенційними (Ser, Thr або Tyr) сайтами фосфорилювання. Близько половини з них спостерігались експериментально (Hanger, D.P. et al. (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054) і групуються навколо кінцевих залишків доменів, що зв'язуються з мікротрубочками. Тау-білок піддається динамічному фосфорилюванню і дефосфорилюванню в ході клітинного циклу. Він повинен дисоціювати від мікротрубочок, щоб забезпечити проходження мейозу. Його головною роллю в постмітотичних клітинах (диференційованих нейронах) є дія як стабілізатора мікротрубочок, що забезпечує оптимальний аксональний транспорт. Він може асоціюватися з мікротрубочками тільки в своїй головним чином дефосфорилованій формі, тому фосфорилювання виступає як безпосередній перемикач асоціації з мікротрубочками/дисоціації від мікротрубочок в нейроні. За нормальних умов цитозольний тау-білок в середньому містить два фосфориловані сайти. У матеріалі парних спіральних філаментів щонайменше 7-8 сайтів є фосфорилованими (Hanger, D.P. et al. (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054). Парні спіральні філаменти гіперфосфорилизованого тау-білка є ключовою характерною особливістю хвороби Альцгеймера (Kosik et al. (1986) *PNAS*, 86, 4044-4048), в імуноцитохімічному аналізі матеріалу головного мозку людини з AD спостерігається чітко виражена зміна рухливості гіперфосфорилизованого тау-білка.

Дослідження тау-білка за допомогою традиційних структурних методик, таких як

рентгенівська кристалографія або ЯМР-спектроскопія, було важким, що відображає його метастабільну природу. Такі дослідження проводилися головним чином стосовно фрагментів доменів нефосфорилованого білка. Єдине до теперішнього часу структурне дослідження повнорозмірного тау-білка (2N4R) за допомогою ЯМР-спектроскопії виявило, що білок містить тільки рідкісні фрагменти стабільної вторинної структури (Mukrasch, M.D. et al. (2009) PLoS. Biol. 7, e34). Цей аналіз указує на те, що вторинна структура пептидного остову має високу схильність приймати структуру  $\beta$ -аркуша. Перші 200 залишків остову є значно більш впорядкованими, ніж С-кінець, що охоплює домени, що зв'язуються з мікротрубочками. Наявність великої кількості специфічних взаємодій дальнього порядку в білку в розчині указує на те, що він існує в сильно невпорядкованому стані розплавленої глобули (Ohgushi, M. and Wada, A. (1983) FEBS Lett. 164, 21-24).

У матеріалі клубків були ідентифіковані продукти розщеплювання тау-білка протеазами, що утворюються, зокрема, під дією каспази і кальпайну (Asp13, Glu391 і Asp421) (Gamblin, T.C. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 10032-10037). Зокрема, усікання по Asp421 детально вивчалось із застосуванням антитіла C3 до тау-білка, яке зв'язується з вільним кінцем Asp421. Було висунуто припущення, що це усікання є ранньою подією в патогенезі AD, що асоціюється з індукцією апоптозу (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201-1204). N-кінцеве розщеплювання по Asp13 і С-кінцеве розщеплювання по Glu391 вважаються за пізні події в патогенезі (deCalignon A. et al. (2010) Nature 464, 1201-1204; Delobel, P. et al. (2008) Am. J. Pathol. 172, 123-131). Недавно в CSF від пацієнтів з AD і PSP був ідентифікований додатковий N-кінцевий фрагмент (залишки 1-224), і була висунута гіпотеза, що він є раннім маркером захворювання і особливо патогенним (US 14/092539; Bright, J. et al. (2014) Neurobiol. Ageing, 1-17). Про аналогічний фрагмент, що утворюється в результаті розщеплювання кальпайном, повідомляли інші групи (Ferreira, A. and Bigio, E.H. (2011) Mol. Med. 17, 676-685; Reinecke, J.B. et al. (2011) PLoS. One. 6, e23865).

Було висунуто припущення, що, окрім гіперфосфорилювання і фрагментації тау-білка, посттрансляційне ацетилювання (Cohen, T.J. et al. (2011) Nat. Commun. 2, 252; Min, S.W. et al. (2010) Neuron 67, 953-966) і O-GlcNAцилювання (Zhu, Y. et al. (2014) J. Biol. Chem.) є процесами, що визначають патологію, при формуванні патології клубків, що асоціюється з AD.

### III. Види імунотерапії із застосуванням тау-білка

Види імунотерапії традиційно розділяються на пасивні і активні підходи до вакцинації. При активному підході до вакцинації патогенний засіб вводять пацієнтові шляхом ін'єкції, і система природженого імунітету викликає імунну відповідь. Це запускає дозрівання В-клітин, що виробляють високоафінні антитіла до введеного антигену. При пасивному підході до вакцинації запуску системи природженої імунної відповіді уникають шляхом інфузії антитіла, специфічного до антигену. Власна система очищення організму потім видаляє зв'язаний з антитілом ліганд.

АС Immune надає моноклональне мишаче антитіло до фосфосерину-409 тау-білка. Визначали профіль антитіл до антигенів тканини головного мозку людини з AD і контрольної тканини головного мозку, і їх відбирали на підставі їх здатності до розпізнавання патології клубків. Обидва гуманізовані варіанти двох антитіл hACI-36-2B6-Ab1 і hACI-36-3A8-Ab1 зв'язуються з епітопом тау-білка в межах амінокислот 401-418 (WO 2013/151762).

Група Roger Nitsch виділила аутоантитіла до тау-білка від немолодих здорових індивідуумів без ознак дегенеративної таупатії. Було виділено ряд антитіл із застосуванням повнорозмірного рекомбінантного людського тау-білка (2N4R) для виявлення антитіл, специфічних до тау-білка. Їх потім піддавали скринінгу стосовно їх здатності до розрізнення ізолятів тау-білка від хворих і здорових індивідуумів. Три провідні антитіла 4E4, 4A3 і 24B2 були описані в патентній літературі (WO 2012049570; US 2012087861). Картування їх епітопів указує на те, що всі вони розпізнають амінокислоти в межах ділянки зв'язування з мікротрубочками і в С-кінцевому напрямку від нього в положеннях від V339 до K369. Ці антитіла не проявляють будь-яку фосфоспецифічність.

C2N Diagnostics фокусується головним чином на розробці засобів діагностики для раннього виявлення нейродегенеративного захворювання. Отримували антитіла до повнорозмірного людського і мишачого тау-білка. Ідентифікували вісім і п'ять антитіл, що розпізнають, відповідно, людський і мишачий тау-білок (Yanamandra, K. et al. (2013) Neuron 80, 402-414). Три антитіла з різними показниками кінетики зв'язування відбирали для оцінювання *in vivo*. А саме це були HJ9.3, HJ9.4 і HJ8.5, які розпізнають, відповідно, залишки 306-320, 7-13 і 25-30 тау-білка, при цьому останнє є специфічним до людського тау-білка. Антитіла також відбирали на підставі їх здатності до попередження перенесення патології в оригінальному репортерному аналізі механізму дії трансцелюлярного розповсюдження патології тау-білка (Sanders, D.W. et al. (2014) Neuron 82, 1271-1288; Kfoury, N. et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 19440-19451). Їх оцінювання в дослідженнях з тривалою і.c.v. ін'єкцією у трансгенних мишей P301S продемонструвало їх

здатність до зменшення рівнів гіперфосфорилизованого тау-білка, визначену за забарвлюванням AT8 в імуногістохімічному аналізі оброблених мишей.

Антитіла Peter Davies спочатку розробляли як засоби діагностики, які можуть забезпечувати встановлення відмінностей між патологічним і нормальним тау-білком в матеріалі головного мозку з AD і контрольним матеріалом головного мозку (Greenberg, S.G. and Davies, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5827-5831). Оцінювання терапевтичної корисності антитіл PHF1 і MC1 було продемонстровано у мишей P301S і JPNL3 (P301L) (Boutajangout, A. et al. (2011) J. Neurochem. 118, 658-667; Chai, X. et al. (2011) J. Biol. Chem. 286, 34457-34467; D'Abramo, C. et al. (2013) PLoS. One. 8, e62402). PHF1 розпізнає лінійний епітоп фосфорилизованого тау-білка (pS396, pS404), тоді як MC1 є конформаційно-залежним антитілом, яке розпізнає структурний епітоп тау-білка, для якого потрібно дві окремі частини лінійної послідовності, епітоп в межах залишків 46-202 і C-кінцевий епітоп між залишками 312-342 (Jicha, G.A. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 48, 128-132). Ін'єкція цих двох антитіл в дослідженнях з тривалою 12-13-тижневою імунізацією приводила до істотного зменшення патології спинного мозку і стовбура головного мозку серед інших ділянок головного мозку, що перетворювалося на ослаблення рухового дефіциту, спостережуваного у цих мишей. (D'Abramo, C. et al. (2013) PLoS. One. 8, e62402).

iPerian/Bristol Meyers Squibb розробили антитіла до тау-білка, направлені на передбачувані патологічні молекули тау-білка, що складаються з N-кінцевого фрагмента тау-білка (eTau: залишки 1-224), які сприяли гіперактивності в культурах нейронів з індукованих плюрипотентних стовлових клітин. Був розроблений портфель антитіл, але отримання характеристик було сфокусовано на антитілах IPN001 і IPN002, які розпізнають N-кінцевий епітоп в межах залишків 9-18. Відповідно, ці антитіла виявляють підвищені рівні тау-білка в CSF від пацієнтів зі встановленою стадією AD і PSP, які можуть бути ранньою ознакою захворювання. Ін'єкції антитіл мишам JPNL3 (P301L) in vivo приводили до часткового усунення прогресуючих рухових дефіцитів (US 14/092539).

Einar Sigurdsson розробив першу програму, що демонструє ефективність імунотерапії на основі застосування тау-білка. Для імунізації мишей JPNL3 (P301L) застосовували активну вакцину, що складається з пептиду тау-білка 379-408 [pS396, pS404] разом з ад'ювантом Adju-Phos. У цьому дослідженні спостерігали виражене зменшення патології тау-білка у мишей, оброблених вакциною, в порівнянні з контрольними тваринами. Також виявляли ослаблення рухового фенотипу, пов'язаного з таупатією. Його ефективність підтверджували в іншій мишачій моделі (htau/PS1), що функціонує без дії мутантного тау-білка (Boutajangout, A. et al. (2011) AAIC 2011 (7, issue 4, Supplement edn) p. s480-s431; Congdon, E.E. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 35452-35465; Gu, J. et al. (2013) J. Biol. Chem. 288, 33081-33095).

У Prothena оцінили три антитіла до тау-білка у трансгенних по тау-білку мишей K369I (K3) і в мишачій моделі P301L. Антитіла з різними властивостями відбирали для оцінювання in vivo. Два антитіла до pS404 з різними ізотипами (IgG1/k і IgG2a/k) або загальне (панспецифічне) антитіло до тау-білка (IgG1/k) ін'єктували в рамках парадигми тривалого дослідження. Мишей K369I обробляли шляхом щотижневих ін'єкцій протягом 21 тижня, починаючи з віку 3 тижнів, а мишей P301L обробляли протягом 7 місяців шляхом щотижневих ін'єкцій, починаючи з віку 4 місяців. У мишей K3, оброблених антитілом IgG2a/k до pS404, спостерігали зменшення кількості позитивних по тау-білку нейрофібрилярних включень. Обидва антитіла до pS404 були здатні зменшувати рівні pS422-позитивного тау-білка, тоді як у мишей, оброблених панспецифічним антитілом до тау-білка, зменшення не спостерігалось. Ці дослідження дозволяють припустити, що: 1) очищення від тау-білка може залежати від ізотипу, і 2) може бути важливою цілеспрямована дія на молекули тау-білка, що мають відношення до захворювання, оскільки загальне антитіло до тау-білка було не здатне зменшувати рівні гіперфосфорилизованого тау-білка (PCT/US2014/025044).

Автори цього винаходу несподівано виявили антитіла, специфічні до фосфорилизованого серинового залишку 396 тау-білка (pS396); це контрастує з антитілами з попереднього рівня техніки, які розпізнають головним чином тау-білки, фосфоризовані як по залишку 396, так і по залишку 404, фосфоризовані тільки по залишку 404 або по іншим залишкам тау-білка.

Автори цього винаходу розробили антитіла, які додатково характеризуються значною специфічністю і селективністю стосовно патологічного людського тау-білка. Існує необхідність в антитілах, що характеризуються високим ступенем селективності і специфічності стосовно патогенного тау-білка. Антитіла за цим винаходом демонструють набагато вищий ступінь специфічності і селективності стосовно патологічного людського тау-білка в порівнянні з непатологічним тау-білком, ніж антитіла з WO 2013/050567 (див. фігуру 1 з WO 2013/050567). Утворення антитіл з WO 2012/045882, які, як повідомлялося, характеризуються специфічним зв'язуванням, викликалося у відповідь на амінокислотні послідовності з 6-9 залишками з

амінокислот 393-401, 396-401, 394-400 і 393-400 тау-білка. Це контрастує з антитілами за цим винаходом, утворення яких відбувається у відповідь на патогенний гіперфосфорилований тау-білок, що містить довшу амінокислотну послідовність, описану в даному описі.

Як показано в прикладах, порівняння з п'ятьма опублікованими антитілами до тау-білка: hACI-2B6 (описаним в WO 2013151762); IPN002 (описаним в WO 2014028777); HJ8.5 (описаним в WO 2014008404); моноклональним антитілом 2.10.3 до тау-білка pS422 (описаним в US8609097); PHF13 (комерційно доступним антитілом (наприклад, Sigma-Aldrich), рекомендованим для виявлення тау-білка, фосфорилизованого по Ser 396, мишачого, щурячого і людського походження і обговорюваним Sankaranarayanan (PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0125614 May 1, 2015 і Otvos (Biochemistry 1997, 36, 8114-8124); а також антитілом 4E4 (описаним в US8940272, як таке, що зв'язується з V339, E342, D387, E391 і K395) показало, що антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом проявляють вищий ступінь специфічності і селективності стосовно патологічного людського тау-білка, ніж будь-які з порівнюваних антитіл.

Додатково, антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом демонструють багато переважних ознак, таких як здатність розрізняти патологічний і непатологічний людський тау-білок і, зокрема, до зв'язування з тау-білком, що асоціюється з альцгеймеровською (AD) патологією. У електрофізіологічних дослідженнях антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом були додатково здатні усувати зменшені парне полегшення і мимовільний мініатюрний збуджувальний синаптичний струм (mEPSC).

Суть винаходу

Цей винахід відноситься до моноклональних антитіл і їх епітопзв'язувальних фрагментів, здатних специфічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком серином-396 людського тау-білка (ізоформи 2N4R) (SEQ ID NO: 33), і до тих антитіл, які були отримані за допомогою нового способу, що забезпечує таке специфічне виділення і добування. Антитіла додатково характеризуються своєю здатністю розрізняти фосфориловані залишки 396 і 404, так що вони практично не зв'язуються з фосфорилованим залишком 404.

Без обмеження будь-якою конкретною теорією дані авторів цього винаходу демонструють, що розрізняльна здатність і селективність антитіл за цим винаходом стосовно людського тау-білка, фосфорилизованого по залишку 396, у присутності тау-білка, фосфорилизованого по залишку 404, але не по 396, є значущими з погляду патологічної і терапевтичної перспективи. Антитіла за цим винаходом є селективними стосовно патологічного тау-білка у присутності непатологічного, але при цьому фосфорилизованого, тау-білка. Антитіла за цим винаходом здатні викликати виснаження клубків тау-білка з патологічного тау-білка у присутності нормального тау-білка. Без обмеження будь-якою конкретною теорією вважають, що виснаження клубків тау-білка, що містять тау-білок, який був фосфорилований в положенні 396 тау-білка, попереджає затравлювальну дію патологічного тау-білка з утворенням клубків тау-білка. Відповідно, один аспект цього винаходу відноситься до антитіла, здатного селективно зв'язуватися з фосфорилованим в положенні 396 тау-білком навіть в тих випадках, коли такі молекули знаходяться у присутності тау-білка, який був фосфорилований в положенні 404 тау-білка. Пов'язаний аспект цього винаходу відноситься до антитіла, здатного селективно зв'язуватися з фосфорилованим в положенні 396 тау-білком навіть в тих випадках, коли такі молекули знаходяться у присутності непатогенного тау-білка. Як визначено додатково, цей винахід відноситься до антитіла, селективного стосовно патологічного тау-білка, при цьому вказаний патологічний тау-білок є гіперфосфорилованим тау-білком, що виявляється у вигляді смуги, відповідної 64 кДа (у вестерн-блот-аналізі), у трансгенних мишей, що надмірно експресують ізоформу 2N4R людського тау-білка.

Один аспект цього винаходу направлений на антитіло до тау-білка, що задовольняє наступним критеріям тестування: i) антитіло не зв'язується з нефосфорилованим тау-білком; ii) антитіло не зв'язується з тау-білком, фосфорилованим в 404 і не фосфорилованим в 396; iii) антитіло зв'язується з тау-білком, фосфорилованим в 396; і iv) антитіло зв'язується з тау-білком, фосфорилованим як в 396, так і в 404. Автори цього винаходу виявили, що зв'язування відповідно до критеріїв тестування iii) і iv) має один і той же порядок величини, і припустили, що фосфорилювання в положенні 404 не перешкоджає процесу зв'язування, так само як і не підсилює його. Автори цього винаходу додатково виявили, що, в протилежність критерію тестування ii), зв'язування з тау-білком, який не є фосфорилованим в 396, але є фосфорилованим в 404, не викликає виснаження клубків або очищення від патологічного тау-білка в тестових моделях.

Один аспект цього винаходу направлений на антитіло до тау-білка, яке при застосуванні з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей rTg4510 специфічно зменшує смуги

гіперфосфорилованого тау-білка розміром 64 і 70 кДа щонайменше на 90 %, зменшуючи при цьому смугу тау-білка розміром 55 кДа не більше, ніж на 10 %. Додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло до тау-білка, яке специфічно зменшує смуги гіперфосфорилованого тау-білка розміром 64 і 70 кДа щонайменше на 90 %, зменшуючи при цьому смугу тау-білка розміром 55 кДа не більше, ніж на 10 %; або яке при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами головного мозку людей з AD має здатність до специфічного зменшення смуг фосфорилованого в S396 гіперфосфорилованого тау-білка щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуг негіперфосфорилованого тау-білка більше, ніж на 10 %.

Інший аспект цього винаходу направлений на спосіб лікування пацієнта з таупатією, такою як хвороба Альцгеймера, який включає виснаження клубків або ослаблення прогресу утворення вказаних клубків, при цьому вказані клубки містять гіперфосфорилований тау-білок, при цьому вказаний спосіб включає приведення гіперфосфорилованого тау-білка в контакт з антитілом за цим винаходом таким чином, що клубки виснажуються, вміст в них гіперфосфорилованого тау-білка зменшується або прогрес утворення клубків ослабляється.

Як визначено в якості альтернативи, цей винахід відноситься до способу лікування пацієнта з таупатією, такою як хвороба Альцгеймера, при цьому вказаний спосіб включає приведення клубків в контакт з антитілом, селективним стосовно тау-білка, що має фосфорилований залишок 396, таким чином, що в клубках відбувається виснаження по гіперфосфорилованому тау-білку.

Конкретніше, цей винахід відноситься до будь-якого з чотирьох моноклональних антитіл, вибраних з групи, що включає:

антитіло C5.2,

де антитіло C5.2 містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22;

антитіло C8.3,

де антитіло C8.3 містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

антитіло C10-2,

де антитіло C10-2 містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14;

і

антитіло D1.2

де антитіло D1.2 містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

Амінокислотні послідовності повних легкого і важкого ланцюгів антитіла C5.2, що наводиться як приклад, включаючи їх константні домени, показані, відповідно, в SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24 (як використовується в прикладах).

Амінокислотні послідовності повних легкого і важкого ланцюгів антитіла C8.3, що наводиться як приклад, включаючи їх константні домени, показані, відповідно, в SEQ ID NO: 31 і SEQ ID NO:



32 (як використовується в прикладах).

Амінокислотні послідовності повних легкого і важкого ланцюгів антитіла C10-2, що представляє інтерес, включаючи їх константні домени, показані, відповідно, в SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16 (як використовується в прикладах). Амінокислотна послідовність важкого ланцюга гуманізованого антитіла C10-2 показана в SEQ ID NO: 35. Амінокислотна послідовність легкого ланцюга гуманізованого антитіла C10-2 показана в SEQ ID NO: 36. Один аспект цього винаходу відноситься до антитіла за цим винаходом, що містить SEQ ID NO: 35 або SEQ ID NO: 36 або їх обидві.

Амінокислотні послідовності повних легкого і важкого ланцюгів антитіла D1.2, що наводиться як приклад, включаючи їх константні домени, показані, відповідно, в SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8 (як використовується в прикладах).

У альтернативному варіанті здійснення антитіло D1.2 містить легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, де амінокислота в положенні 3 є валіном (тоді як в легкому ланцюзі, що наводиться як приклад, в SEQ ID NO: 7 ця амінокислота є метіоніном). Цей легкий ланцюг може знаходитися в парі з важким ланцюгом, описаним вище, тобто таким, що має CDR за SEQ ID NO: 4, 5 і 6. Наприклад, антитіло може містити легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 34, разом з важким ланцюгом, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8 (антитіло "D1.2\*\*").

Один аспект цього винаходу направлений на антитіло, що містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10; і/або
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11.

Додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло, що містить або додатково містить:

- (a) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;
- (b) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і/або
- (c) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна застосовувати в лікуванні таупатій, таких як хвороба Альцгеймера (AD), хвороба аргірофільних зерен (AGD), прогресуючий над'ядерний параліч (PSP), кортикобазальна дегенерація (CBD), TBI (травматичне пошкодження головного мозку, легке, гостре або хронічне) і хронічна травматична енцефалопатія (CTE).

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом додатково призначені для застосування в лікуванні психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD.

Стислий опис ілюстративних матеріалів

Фігура 1. Дот-блот-аналіз зв'язування з патологічним матеріалом

На фігурі 1 (панелі A-B) представлені результати дот-блот-аналізу, що відображають 500 нг фракцій S1 і P3 (утворення фракцій S1 і P3 розкрито в прикладі 3), отриманих з головного мозку пацієнтів з AD (AD) і немолодих здорових індивідуумів (con) або з 32-тижневих тварин одного приплоду rTg4510 і нетрансгенних тварин (wt), які зондували 1 мкг/мл D1.2 або C10-2 для оцінки виявлення патологічного тау-білка (приклад 3). На точковій діаграмі показано, що D1.2 (панель A) або C10-2 (панель B) специфічно реагують з ураженим захворюванням матеріалом від пацієнтів з AD або людським тау-білком (P301L), що експресувався у трансгенних мишей (Tg4510).

Фігура 2. Вестерн-блот-аналіз антитіл D1.2 і C10-2

На фігурі 2 (панелі A-B) представлені результати вестерн-блот-аналізу, що відображають 2 мкг фракцій S1 і P3, отриманих з головного мозку 32-тижневих тварин одного приплоду rTg4510 і нетрансгенних тварин (wt), або 20 мкг фракцій S1 і P3, отриманих з головного мозку пацієнтів з AD (AD) і немолодих здорових індивідуумів (con), які зондували 1 мкг/мл D1.2 (панель A) або C10-2 (панель B). Фракції S1 і P3, які отримували з 0,01 мг тканини, завантажували в співвідношенні 1:50 (за масою тканини). У вестерн-блот-аналізі нормальний людський тау-білок 4R0N з мутацією P301L відображається при 55 кДа, а гіперфосфорилована молекула людського тау-білка 4R0N з мутацією P301L відображається при 64 і 70 кДа. У фракціях P3 з матеріалу з AD гіперфосфорилований тау-білок відображається при 54, 64, 69 і 74 кДа (приклад 3). На фігурі проілюстровано, що антитіла специфічно зв'язуються з гіперфосфорилованим тау-білком із зміною рухливості.

Фігура 3. Зв'язування з патологічним матеріалом P3 на MSD

На фігурі 3 (панелі A-D) представлені результати зв'язування D1.2 (панель A), C5-2 (панель B), C10-2 (панель C) і C8-3 (панель D) в ході ELISA на платформі Meso Scale Discovery (MSD) з

тау-білком, виділеним з головного мозку людей з AD і не ураженим захворюванням контрольним головним мозком (приклад 4). Аналогічно продемонстрованому на фігурі 1, іммобілізацію тау-білка, виділеного з ураженого захворюванням (AD) і здорового контрольного головного мозку, на планшетах для ELISA можна застосовувати для демонстрації того, що

5 антитіла в цьому винаході специфічно зв'язуються з патологічними молекулами тау-білка. Підвищення концентрацій антитіла приводить до насичувального зв'язування. Кількість зв'язаного антитіла виявляють за допомогою вторинного антитіла до мишачих імуноглобулінів.

Фігура 4. Афінітність до пептидів і селективність стосовно pS396 (зв'язування з пептидами)

На фігурі 4 (панелі A-D) представлені результати аналізу специфічного зв'язування C10-2 (панель A) і D1.2 (панель B) з пептидами тау-білка (386-409) зі всіма комбінаціями фосфорилювання в положеннях S396 і S404 (приклад 5). Специфічну афінітність до патологічного матеріалу людини важко оцінити, і з цієї причини автори цього винаходу використовували специфічне зв'язування з пептидами для визначення точної афінітності до епітопу із застосуванням специфічних фосфорилованих і нефосфорилованих пептидів. Специфічні криві залежності доза-відповідь показані для зв'язування антитіл C10-2 (панель C) і D1.2 (панель D) з пептидом TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVS<sup>(p)</sup>SGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37) (pS396/pS404), фосфорилованим по залишках Ser396 і Ser404. Конкурентне зв'язування проводили з нефосфорилованим пептидом (NP) і монофосфорилованими пептидами (pS396 і pS404). Додатково був включений контрольний пептид, відповідний фосфорилованому серину-262.

20 Конкурентне зв'язування демонструє, що у всіх випадках зв'язування досягається за допомогою фосфорилизованого серинового залишку 396. Додатково, дані демонструють, що фосфорилювання по залишку 404 не перешкоджає зв'язуванню антитіл з фосфосерином-396.

Фігура 5. Отримання гістологічними методами характеристик специфічних до патології антитіл

На фігурі 5, панелі A показано, що антитіла C10-2 (лівий стовпець) і D1.2 (правий стовпець) зв'язуються з молекулами рТау в клітинних тілах і нейропілях Tg4510 (верхній ряд). У зрізах головного мозку тварин, відмінних від Tg, імунореактивність не виявлена (нижній ряд). На фігурі 5, панелі B показано, що антитіла C10-2 (лівий стовпець) і D1.2 (правий стовпець) зв'язуються з молекулами рТау в клітинних тілах і нитках нейропілю в донорному матеріалі з AD (AD) (верхній ряд). У контрольному донорному головному мозку відсутня імунореактивність (нижній ряд) (приклад 6).

Фігура 6. Зв'язування з патологічним і непатологічним P3 для C10-2 і еталонних антитіл

На фігурі 6 (панелі A-E) представлені результати, що демонструють перевагу антитіла C10-2 (панель C) за цим винаходом в розпізнаванні патологічного матеріалу в порівнянні з антитілами 2-10-3 (панель A), HAcI-2B6 (панель B), IPN 002 (панель D) і HJ8.5 (панель E) з попереднього рівня техніки. На фігурі показано специфічне зв'язування C10-2 з тау-білком із здорового (як контроль) і ураженого захворюванням (AD) головного мозку людей поряд зі зв'язуванням з тау-білком від мишей Tg4510 у віці 10 місяців, експресуючих людський тау-білок з мутацією P301L. До матеріалу тау-білка P3, іммобілізованого на планшетах для ELISA, додають антитіло в концентраціях, що підвищуються. Ступінь селективності щодо патологічного тау-білка визначають при повному насиченні активними молекулами. Кратність селективності для кожного з антитіл з попереднього рівня техніки показана на фігурі (приклад 7).

Фігура 7. Попередження затравлювальної дії в клітинах HEK293 і in vitro

На фігурі 7 (панелі A-C) представлена кількісна оцінка агрегації тау-білка за допомогою аналізу Cisbio. Клітини HEK293, трансфектовані pcDNA для введення затравки, не продемонстрували сигнал, що підтверджувало відсутність виявлення вхідного затравлювального матеріалу. Затравлювальний матеріал Wt (дикого типу) (WW) не продемонстрував затравлювальної дії, проте, на відміну від цього, гомогенати rTg4510 (CC) характеризувалися ефективною затравлювальною дією в порівнянні з позбавленими затравки.

50 На цей затравлювальний ефект не впливала обробка за допомогою HEL, але він частково усувався шляхом обробки антитілами до тау-білка (C10-2 > D1.2 > hAcI36-2B6-Ab1). На графічних зображеннях (панелі A-C) представлено три незалежні набори зразків, і вони виконані у вигляді діаграми відносної агрегації тау-білка (кратності сигналу щодо фонового рівня, нормалізованого до загального білка) (приклад 8).

Фігура 8. Усунення електрофізіологічного дефіциту

На фігурі 8 показано усунення антитілами дефіцитів парного полегшення (панелі B і D) і базальної синаптичної передачі (панелі A і C) у викликаних польових потенціалах в CA1 (C10-2, панель A; D1.2, панель B), де проілюстровані викликані польові потенціали при обробці CA1 середньої тривалості за допомогою C10-2 у мишей Tg4510 з і мишами tTA як контроль. Тварин обробляли двічі на тиждень дозою 15 мг/кг антитіла протягом двох тижнів (див. приклад 9). На

панелі А (для С10-2) і панелі С (для D1.2) градієнт польових потенціалів (fEPSP) представлений на діаграмі залежно від інтенсивності стимуляції. На панелях А і С проілюстровано, що електрофізіологічна оцінка синаптичної передачі і пластичності в СА1-зоні гіпокампу у мишей rTg4510 (нижні 2 криві) і контрольних мишей tTA (верхні 2 криві) у віці 4,5-5,5 місяців *in vivo* показала: i) значне погіршення базальної синаптичної передачі у мишей rTg4510 в порівнянні з tTA і ii) значне зменшення парного полегшення у мишей rTg4510 в порівнянні з tTA.

Парне полегшення - короткострокову синаптичну пластичність, в основі якої, як вважають, знаходяться пресинаптичні механізми - додатково вимірювали у мишей rTg4510 і tTA (панель В для С10-2 і панель D для D1.2). Стисло, стосовно колатералі Шеффера прикладали пару стимулів з інтервалом між стимулами (ISI), що варіюється від 25 до 1000 мс, і градієнт другого fEPSP порівнювали з градієнтом першого fEPSP. Полегшення спостерігали при всіх ISI з максимальним полегшенням при ISI, що становить 50 і 75 мс. Цікаво, що у мишей rTg4510 спостерігали значно нижчі PPF (другі 2 стовпці) в порівнянні з мишами tTA (перші 2 стовпці).

Фігура 9. Стилий огляд скринінгу, у загальних рисах представленого на фігурах 1-8 Індукували вироблення антитіл до дифосфорилованого пептиду TDHGAIEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVSGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R. Гібридами піддавали скринінгу за допомогою дот-блот-аналізу і MSD-ELISA з іммобілізованим патологічним і непатологічним людським тау-білком (приклад 4) для виділення клонів, які були високоспецифічними до будь-якого з фосфорилованих епітопів S396 і/або S404 і в той же час специфічно розпізнавали гіперфосфорилований тау-білок з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера. Здатність розрізняти патологічний і непатологічний людські тау-білки в ході дот-блот-аналізу і вестерн-блот-аналізу застосовували для відбору гібридом. Відбирали 16 клонів, з яких чотири клони (D1.2, C10-2, C5.2 і C8.3) проявляли надзвичайно високі здатності до зв'язування з патологічним матеріалом людини. У разі застосування специфічного протоколу імунізації і скринінгу виробляються високоспецифічні антитіла до фосфосерину-396 (pS396).

Фігура 10. Залишок pSer396 зв'язується в центрі антигензв'язувальної ділянки mAb C5.2

Представлена кристалічна структура mAb C5.2 в комплексі з фосфорилованим пептидом 386-410 при роздільності 1,9 Å. У цій структурі дозволена електронна щільність для залишків 392-398. Залишок <sup>(p)</sup>Ser396 зв'язується в центрі антигензв'язувальної ділянки mAb C5.2. У цьому структурному дослідженні mAb до тау-білка епітоп зв'язується між важким ланцюгом (справа внизу) і легкими (зліва внизу) ланцюгами.

Фігура 11. Взаємодія антитіла C5.2 з пептидом тау-білка (292-298) з фосфосерином

На фігурі 11 представлена взаємодія між антитілом C5.2 і пептидом тау-білка (292-298) з фосфосерином. Показана структура Ile(392)-Val(393)-Tyr(394)-Lys(395)-P-Ser(396)-Pro(397)-Val(398). У основній взаємодії бере участь гідрофобна кишеня, утворювана L3:H3, L3:F8\*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 і Y(394) пептиду тау-білка. Існує розгалужена мережа водневих зв'язків, що утворюється між сольватованим <sup>(p)</sup>S(396) і L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3. У використуваній номенклатурі перша буква (наприклад, "L" в L3:H3) означає, чи відноситься залишок CDR, що бере участь, до CDR легкого ланцюга або CDR важкого ланцюга, перша цифра означає, яка CDR такого ланцюга бере участь (наприклад, "L3" означає CDR3 легкого ланцюга), решта позначень (наприклад, "H3" в L3:H3) означають назву і положення амінокислоти, що бере участь (наприклад, "H3" означає гістидин в третьому положенні залишку CDR); таким чином, "L3:H3" означає гістидиновий залишок в третьому положенні CDR3 легкого ланцюга. Існують утворення сильних водневих зв'язків і взаємодії зарядів/полярні взаємодії між Y(394) бічного ланцюга і остовом, при цьому фосфонат <sup>(p)</sup>S396 утворює вигин в пептидному остові. (\*) L3:F8 являє собою С-кінцевий залишок каркасної ділянки, фланкуючий CDR L3.

Послідовності CDR C5.2 являють собою:

CDR L1: QASQDTSINLN	(SEQ ID NO: 17)
CDR L2: GASNLED	(SEQ ID NO: 18)
CDR L3: LQHTYLP	(SEQ ID NO: 19)
CDR H1: KASGYTFTDRTIH	(SEQ ID NO: 20)
CDR H2: YIYPGDDSTKYNDNFKG	(SEQ ID NO: 21)
CDR H3: RGTMDY	(SEQ ID NO: 22)

Фігура 12. Виснаження по тау-білку для аналізу затравлювальної дії (HEK293)

На фігурі 12 (панелі А-В) показано імуновиснаження гомогенатів головного мозку rTg4510 за допомогою мишачого C10-2 (mC10-2) і гуманізованого C10-2 (hC10-2). Виявлення у виснажених гомогенатах в ході вестерн-блотингу проводили за допомогою E1 (загальний тау-білок; панель А; нижня частина) і C10-2 (тау-білок pS396; панель А; верхня частина), і як mC10-2, так і hC10-2 здійснювали ефективне виснаження по гіперфосфорилованому тау-білку (верхні смуги на картині блотингу для E1 і всі смуги на картині блотингу для C10-2). Виснажені гомогенати також

аналізували щодо виснаження по агрегованому тау-білку за допомогою аналізу Cисbio. На панелі В показана зміна кількості агрегованого тау-білка в зразках. У дослідженнях виснаження з використанням mC10-2 і hC10-2 агрегати тау-білка були видалені, відповідно, на 99 і 99,5 % (панель В).

5      Фігура 13. Аналіз затравлювальної дії (НЕК293) з виснаженим матеріалом

На панелях А-С показані виснажені гомогенати, вживані для здійснення затравлювальної дії Р301L-hTau в клітинах НЕК293. Гомогенати від контрольних тварин (WW) не демонстрували затравлювальної дії, тоді як гомогенати rTg4510 (CC) характеризувалися ефективною затравлювальною дією, згідно з вимірюванням в ході аналізу агрегації Cисbio в загальних клітинних лізатах або в ході фракціонування клітин НЕК293 в 1 % Triton-X (за кількісною оцінкою нерозчинного гіперфосфорилованого D1.2 і тау-білка (панель А, верхня і нижня частини)). Виснаження за допомогою антитіл HEL і hHEL не впливало на затравлювальну дію, тоді як виснаження за допомогою mC10-2 і hC10-2 попереджало агрегацію тау-білка на 88 % і 96 % (панель С), а нерозчинного тау-білка на 97 % і 100 % (панель В), відповідно.

15      Фігура 14. Імуновиснажений матеріал rTg4510 (вживаний для досліджень затравлювальної дії in vivo)

На панелях А-С продемонстрований вестерн-блот-аналіз (панель А; верхня, нижня частини) імуновиснажених екстрактів головного мозку rTg4510. C10-2 і D1.2 специфічно зменшують смугу гіперфосфорилованого людського білка розміром 64 кДа на 90 % і не діють на тау-білок розміром 55 кДа. Тау5, комерційне антитіло до загального тау-білка, на відміну від цього, зменшує смугу нормального тау-білка розміром 55 кДа на 74 % і не діє на людський тау-білок розміром 64 кДа (панелі В-С).

Фігура 15. Імуновиснажений матеріал з AD (вживаний для досліджень затравлювальної дії in vivo)

25      На фігурі 15 (панелі А-С) зображений вестерн-блот-аналіз (панель А) імуновиснажених екстрактів головного мозку з хворобою Альцгеймера. Імуновиснаження за допомогою C10-2 і D1.2 не приводить до зменшення рівнів загального тау-білка більше, ніж на 10 %, але обумовлює специфічне зниження рівня гіперфосфорилованого тау-білка (90 % зменшення) (панелі В-С).

30      Фігура 16 (панель А). Патологія тау-білка в гіпокампах у мишей rTg4510 з затравкою імуновиснаженим матеріалом rTg4510

На фігурі 16 (панель А) проілюстрована кількісна оцінка патології тау-білка в головному мозку rTg4510 з затравкою гомогенатами головного мозку rTg4510 або з AD. Перед введенням затравки рівень гіперфосфорилованого тау-білка, але не нормального тау-білка, був зменшений в гомогенатах на 90-95 % шляхом застосування C10-2 або D1.2. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індукують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка.

Фігура 16 (панель В). Патологія клубків в гіпокампах мишей rTg4510 з затравкою імуновиснаженим матеріалом з AD

40      На фігурі 16 (панель В) проілюстрована кількісна оцінка патології тау-білка в головному мозку rTg4510 з затравкою гомогенатами головного мозку rTg4510 (А) або з AD (В). Перед введенням затравки рівень гіперфосфорилованого тау-білка, але не нормального тау-білка, був зменшений в гомогенатах на 90-95 % шляхом застосування C10-2 або D1.2. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індукують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка.

Фігура 17. Патологія клубків в гіпокампах мишей rTg4510 з затравкою, оброблених D1.2

На фігурі 17 зображена кількісна оцінка нейронів, що містять клубки, в гіпокампах мишей rTg4510 з затравкою. Дана патологія збільшується за часом (IgG-1 місяць; IgG-2 місяці; IgG-3 місяці). Проте після обробки мишей за допомогою D1.2 патологія значно зменшувалася через 1, 2 і 3 місяці після введення затравки. (D1.2-1 місяць; D1.2-2 місяці; D1.2-3 місяці).

Фігура 18. Виснаження по тау-білку для аналізу затравлювальної дії (НЕК293)

На панелі А показано імуновиснаження гомогенатів головного мозку rTg4510 за допомогою мишачого C10-2 (mC10-2) і гуманізованого C10-2 (hC10-2). Виявлення у виснажених гомогенатах в ході вестерн-блотингу проводили за допомогою E1 (загальний тау-білок) і C10-2 (тау-білок pS396), і як mC10-2, так і hC10-2 здійснювали ефективно виснаження по гіперфосфорилованому тау-білку (верхні смуги на картині блотингу для E1 і всі смуги на картині блотингу для C10-2). Виснажені гомогенати аналізували стосовно виснаження по агрегованому тау-білку за допомогою аналізу Cисbio. На панелі В показано виснаження з використанням mC10-2 і hC10-2, в ході якого агрегати тау-білка були видалені, відповідно, на 99 і 99,5 %.

Фігура 19. Аналіз затравлювальної дії (НЕК293) з виснаженим матеріалом

На панелі А показано фракціонування тау-білка (вестерн-блотинг нерозчинної фракції). На панелі В показана кількісна оцінка вестерн-блотингу. На панелі С показаний агрегований тау-білок в клітинних лізатах. Виснажені гомогенати застосовували для здійснення затравлювальної дії Р301L-hTau в клітинах НЕК293. Гомогенати від контрольних тварин (WW) не демонстрували затравлювальної дії, тоді як гомогенати rTg4510 (CC) характеризувалися ефективною затравлювальною дією, згідно з вимірюванням в ході аналізу агрегації Cисbio в загальних клітинних лізатах або в ході фракціонування клітин НЕК293 в 1 % Triton-X (за кількісною оцінкою нерозчинного гіперфосфорилованого D1.2+ тау-білка). Виснаження за допомогою антитіл hEL і hNEL не впливало на затравлювальну дію, тоді як виснаження за допомогою mC10-2 і hC10-2 (панель С) попереджало агрегацію тау-білка на 88 % і 96 %, а нерозчинного тау-білка на 97 % і 100 %, відповідно (панель В).

Фігура 20. Імуноселективність C10-2 і D1.2 щодо гіперфосфорилованого тау-білка в порівнянні з нормальним тау-білком

Імуновиснажений матеріал rTg4510 застосовували для досліджень затравлювальної дії *in vivo*. На панелі А показаний вестерн-блот-аналіз імуновиснажених екстрактів головного мозку rTg4510. На панелі В показано, що C10-2 і D1.2 специфічно зменшують смугу гіперфосфорилованого білка розміром 64 кДа, фосфорилованого по серину-396, в порівнянні із смугою тау-білка розміром 55 кДа, який не містить значну кількість р396. На відміну від цього, Tau5, комерційне антитіло до загального тау-білка, зменшує смугу нормального тау-білка розміром 55 кДа і є неефективним в зв'язуванні з тау-білком розміром 64 кДа.

Фігура 21. Імуноселективність C10-2 і D1.2 щодо гіперфосфорилованого тау-білка в порівнянні з нормальним тау-білком

Імуновиснажений матеріал з AD застосовували для досліджень затравлювальної дії *in vivo*. На панелі А показаний вестерн-блот-аналіз імуновиснажених екстрактів головного мозку з хворобою Альцгеймера. Імуновиснаження за допомогою mC10-2 і D1.2 не приводить до зменшення рівнів загального тау-білка більше, ніж на 10 % (панель В), але обумовлює специфічне зниження рівня гіперфосфорилованого тау-білка (90 % зменшення) (панель С).

Фігура 22. Патологія тау-білка в гіпокампах мишей rTg4510

На панелі А показана патологія тау-білка в гіпокампах у мишей rTg4510 з затравкою імуновиснаженим матеріалом rTg4510. На панелі В показана патологія клубків в гіпокампах у мишей rTg4510 з затравкою імуновиснаженим матеріалом з AD. Показана кількісна оцінка патології тау-білка в головному мозку rTg4510 з затравкою гомогенатами головного мозку rTg4510 (А) або з AD (В). Перед введенням затравки рівень гіперфосфорилованого тау-білка, але не нормального тау-білка, був зменшений в гомогенатах на 90-95 % шляхом застосування антитіл C10-2 або D1.2. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індукують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка.

Фігура 23. Патологія клубків в гіпокампах мишей rTg4510 з затравкою, оброблених D1.2

Показана кількісна оцінка нейронів, що містять клубки, в гіпокампах мишей rTg4510 з затравкою. На фігурі показано, що патологія збільшується за часом, і при обробці мишей за допомогою D1.2 патологія значно понижена через 2 і 3 місяці після введення затравки.

Фігура 24. Вестерн-блот-аналіз імуновиснажених екстрактів від людей з AD

На фігурі проілюстровано, що гуманізований варіант C10-2 (hC10-2), а також mC10-2 відрізняються від антитіла 2.10.3 (P-S422) тим, що, хоча рівень загального тау-білка, що залишається, неістотно відрізняється (ліва панель) від рівня у випадку з 2.10.3, C10-2 (hC10-2), а також mC10-2 видалюють більшу кількість гіперфосфорилованого тау-білка, присутнього в екстрактах головного мозку з хворобою Альцгеймера, за допомогою способів імуновиснаження. Це підтверджується на фігурі 25 шляхом кількісної оцінки.

Фігура 25. Кількісна оцінка агрегованого тау-білка після імуновиснаження

Антитіла hC10-2 і mC10-2 відрізняються від антитіла 2.10.3 своєю здатністю до видалення більшої кількості агрегованого тау-білка, присутнього в екстрактах головного мозку з хворобою Альцгеймера, за допомогою способів імуновиснаження.

Фігура 26. Загальний тау-білок, що залишається після імуновиснаження

Показана кількісна оцінка сигналів вестерн-блотингу після імуновиснаження екстрактів матеріалу з хворобою Альцгеймера за допомогою різних кількостей гуманізованого C10-2 (▲) і антитіла 2.10.3 (◆). На фігурі 26 показана кількісна оцінка сигналу загального тау-білка із застосуванням Tau5 (всі ізоформи тау-білка були включені в аналіз). Обидва антитіла видаляли невелику частку тау-білка з препарату головного мозку суб'єкта з хворобою Альцгеймера. 2.10.3, сконструйоване таким чином, що воно має специфічність до тау-білка P-S422, видаляє до 24 % від загальної кількості тау-білка, а C10-2 видаляє до 15 % загального тау-білка (див.

фігуру 26).

Фігура 27. Загальний тау-білок, що залишається після імуновиснаження по гіперфосфорилованому тау-білку

На фігурі 27 проілюстрована кількісна оцінка гіперфосфорилизованого тау-білка, фосфорилизованого по серину-422 (всі смуги і високомолекулярний шмер були включені в аналіз). Як 2.10.3 (▲), так і C10-2 (◆) видаляють більше 90 % тау-білка, фосфорилизованого по серину-422. Проте кількість антитіла, необхідна для видалення 50 % тау-білка, розрізняється: у випадку з антитілом 2.10.3 необхідно 0,42 мкг антитіла, тоді як у випадку з C10-2 для того ж ефекту необхідно 0,27 мкг.

Фігура 28. Загальний тау-білок, що залишається після імуновиснаження по гіперфосфорилованому тау-білку

Показана кількісна оцінка гіперфосфорилизованого тау-білка, фосфорилизованого по серину-396 (всі смуги і високомолекулярний шмер були включені в аналіз). C10-2 (◆) ефективно видаляє тау-білок, фосфорилований по серину-396 (максимальний ефект: 88 %, і половина цього ефекту досягається при застосуванні 0,30 мкг антитіла). 2.10.3 (▲) видаляє меншу частину тау-білка, фосфорилизованого по серину-396 (максимальний ефект: 60 %, і половина цього ефекту досягається при застосуванні 0,63 мкг антитіла). Це указує на те, що весь тау-білок, фосфорилований по серину-422, також є фосфорилованим по серину-396, але існує частина гіперфосфорилизованого тау-білка, фосфорилизованого по серину-396, в якому відсутній фосфорилований серин в положенні 422.

Фігура 29. Загальний тау-білок, що залишається після імуновиснаження по гіперфосфорилованому тау-білку

Показана кількісна оцінка гіперфосфорилизованого тау-білка, фосфорилизованого по серину-199/202 (всі смуги і високомолекулярний шмер були включені в аналіз). Значна частина тау-білка, що видаляється C10-2 (◆), також є фосфорилованою по серину-199/202, оскільки 69 % тау-білка, що має таке фосфорилювання, підпадає під вплив імуновиснаження (50 % ефект при застосуванні 0,34 мкг антитіла). Імуновиснаження за допомогою 2.10.3 (▲) не давало сигмоїдальну криву залежності доза-відповідь для тау-білка P-S199/202, хоча при підвищенні кількості антитіла спостерігається зниження інтенсивності сигналу (максимальне зменшення 52 % при застосуванні максимальної кількості антитіла (5 мкг). Ці дані указують на те, що антитіло C10-2, що націлюється на фосфорилований серин-396, зв'язується з більшим пулом гіперфосфорилованих тау-білків, ніж антитіло 2.10.3, що націлюється на фосфорилований серин в положенні 422.

Фігура 30. Інгібування mD1.2 і mC10-2 захоплення антигенного тау-білка в планшетах, покритих mC10-2

Це відбувалося в рамках рідиннофазного ELISA, де суміш препарату P3 гTg4510 і різних кількостей антитіл C10-2 або D1.2 додавали на планшети, покриті C10-2. Чим більше антитіл зв'язувалися з тау-білком P3 в розчині, тим менше доступних епітопів тау-білка могли зв'язуватися з планшетами. Величину зв'язування тау-білка з планшетами визначають за допомогою антитіла до людського тау-білка, міченого SULFO-TAG. C10-2 (π) і D1.2 (□) характеризуються різним зв'язуванням з тау-білком в розчині, при цьому зв'язування з C10-2 може повністю перевершувати зв'язування з планшетами (IC<sub>50</sub>=20 нМ). В той же час D1.2 демонструє дуже низький рівень зв'язування з тау-білком в розчині.

Фігура 31. Інгібування PHF13 і mC10-2 захоплення антигенного тау-білка в планшетах, покритих mC10-2

В рамках рідиннофазного ELISA суміш препарату P3 з матеріалу з AD і різних кількостей антитіл C10-2 і PHF13 додавали на планшети, покриті C10-2. Чим більше антитіл зв'язувалися з тау-білком P3 в розчині, тим менше доступних епітопів тау-білка могли зв'язуватися з планшетами. Величину зв'язування тау-білка з планшетами визначають за допомогою антитіла до людського тау-білка, міченого SULFO-TAG. C10-2 і PHF13 характеризуються різним зв'язуванням з тау-білком в розчині, при цьому зв'язування з C10-2 може повністю перевершувати зв'язування з планшетами (IC<sub>50</sub>=3 нМ), тоді як у випадку з PHF13 це не відбувається.

Фігура 32. Як mC10-2, так і PHF-13 зв'язуються з рTau 386-408 (pS396/pS404) дозозалежним чином

На фігурі 32 показано, що mC10-2 і PHF-13 в рівній мірі добре зв'язуються в планшетах MSD, покритих 100 нг/мл рTau 386-408 (pS396/pS404). Антитіла в концентраціях, що підвищуються (вказаних по осі x), інкубували в лунках протягом 2 годин з подальшим промиванням і виявленням зв'язаних антитіл за допомогою антитіл до людського IgG, мічених SULFO-TAG. Це указує на те, що отримане PHF-13, вживане в подальших прикладах, є

активним.

Фігура 33. Порівняння зв'язування mD1.2 і mC10-2 з AD-P3

На фігурі 33 показано, що mD1.2 і mC10-2 в рівній мірі добре зв'язуються в планшетах MSD, покритих 1 мкг/мл AD-P3. Антитіла в концентраціях, що підвищуються (вказаних по осі x), інкубували в присутності і у відсутності 10 мкМ пептиду pTau 386-408 (pS396/pS404) протягом 1 години при кімнатній температурі з подальшою інкубацією в лунках протягом 2 годин перед виявленням зв'язаних антитіл за допомогою антитіл до людського IgG, мічених SULFO-TAG. Значення IC50 складали 320 нМ і 11 нМ для захоплення AD-P3 і AD-S1(p). На відміну від цього, mD1.2 продемонструвало значно слабкіше інгібування захоплення антигенного тау-білка при значеннях IC50, що становлять 589 і 503 нМ, що дозволяє припустити значно нижчу афінність зв'язування з розчинними антигенами.

Аналіз виконували в дві стадії. А: 1 мкг/мл AD-P3 і 20 нг/мл AD-S1(p), відповідно, інкубували з mD1.2 і mC10-2 в концентраціях, що підвищуються, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі для забезпечення підвищення зв'язування антитіла і антигену (зайнятості). В: зразки інкубували на планшетах MSD, покритих AD-P3 (1 мкг/мл), протягом 2 годин з подальшим промиванням і виявленням захоплених антигенних тау-білків за допомогою антитіл до загального тау-білка, мічених SULFO-TAG.

Фігура 34. mC10-2, але не PHF-13, ефективно зв'язується з антигенами AD-P3, представленими на твердій фазі

Високоспецифічне зв'язування mC10-2, але не PHF-13: на фігурі 34 показано, що mC10-2 ефективно зв'язується з планшетами MSD, покритими антигенами AD-P3 (1 мкг/мл). Для порівняння, низька активність зв'язування PHF-13 указує на нижчу афінність до фізіологічних антигенів pTau. Додатково, PHF-13 демонструвало значно вищий ступінь неспецифічного зв'язування в порівнянні з mC10-2 (див. таблицю 6). Антитіла в концентраціях, що підвищуються (вказаних по осі x), інкубували протягом 2 годин перед виявленням зв'язаних антитіл за допомогою антитіл до людського IgG, мічених SULFO-TAG. У сигнал зв'язування вносили поправку на активність неспецифічного зв'язування (визначену як сигнали, виміряні у присутності 10 мкМ пептиду pTau 386-408 (pS396/pS404)). Значення IC50 складало 3 нМ для захоплення mC10-2 AD-P3. На відміну від цього, PHF-13 практично не продемонструвало інгібування.

Аналіз виконували в дві стадії. А: 1 мкг/мл AD-P3 інкубували з mC10-2 і PHF-13 в концентраціях, що підвищуються, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі для забезпечення підвищення зв'язування антитіла і антигену (зайнятості). В: зразки інкубували на планшетах MSD, покритих AD-P3 (1 мкг/мл), протягом 2 годин з подальшим промиванням і виявленням захоплених антигенних тау-білків за допомогою антитіл до загального тау-білка, мічених SULFO-TAG.

Послідовності, включені шляхом посилання

SEQ ID NO: 1	CDR1 легкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 2	CDR2 легкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 3	CDR3 легкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 4	CDR1 важкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 5	CDR2 важкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 6	CDR3 важкого ланцюга D1.2
SEQ ID NO: 7	легкий ланцюг D1.2
SEQ ID NO: 8	важкий ланцюг D1.2
SEQ ID NO: 9	CDR1 легкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 10	CDR2 легкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 11	CDR3 легкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 12	CDR1 важкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 13	CDR2 важкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 14	CDR3 важкого ланцюга C10-2
SEQ ID NO: 15	легкий ланцюг C10-2
SEQ ID NO: 16	важкий ланцюг C10-2
SEQ ID NO: 17	CDR1 легкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 18	CDR2 легкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 19	CDR3 легкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 20	CDR1 важкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 21	CDR2 важкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 22	CDR3 важкого ланцюга C5.2
SEQ ID NO: 23	легкий ланцюг C5.2

SEQ ID NO: 24 важкий ланцюг C5.2  
 SEQ ID NO: 25 CDR1 легкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 26 CDR2 легкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 27 CDR3 легкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 28 CDR1 важкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 29 CDR2 важкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 30 CDR3 важкого ланцюга C8.3  
 SEQ ID NO: 31 легкий ланцюг C8.3  
 SEQ ID NO: 32 важкий ланцюг C8.3  
 SEQ ID NO: 33 людський тау-білок  
 SEQ ID NO: 34 легкий ланцюг D1.2\*  
 SEQ ID NO: 35 важкий ланцюг гуманізованого C10-2  
 SEQ ID NO: 36 легкий ланцюг гуманізованого C10-2  
 SEQ ID NO: 37 залишки 386-408 тау-білка (pS396, pS404)

Докладний опис винаходу

Використовуваний в даному описі термін "тау" є синонімом "тау-білка" і відноситься до будь-якої з ізоформ тау-білка (ідентифікованих, наприклад, в UniProt як P10636, 1-9). Нумерація амінокислот тау-білка, використовувана в даному описі, приведена стосовно ізоформи 2 (SEQ ID NO: 33), показаної нижче, при цьому метіонін (M) є амінокислотним залишком 1.

SEQ ID NO: 33:

MAEPRQFEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT  
 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG  
 TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  
 IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP  
 GSPGTPGSRs RTPSLTPPT REPKKVAVVR TPKSPSSAK SRLQTAPVPM  
 PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  
 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV  
 QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS  
 GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

Цей винахід відноситься до антитіл і їх епітопзв'язувальних фрагментів, які здатні специфічно зв'язуватися з тау-білком, і зокрема, з людським тау-білком, і в одному варіанті здійснення проявляють здатність до специфічного зв'язування з фосфорилованим залишком S396 (pS396) людського тау-білка. Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом додатково характеризуються тим, що вони не здатні або практично не здатні специфічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404 (pS404) в людському тау-білку, наприклад, в умовах обмеженої кількості антитіл або ненасичувальних умовах. Додатково, фосфорилювання в pS404 не перешкоджає специфічному зв'язуванню з pS396. Використовувані в даному описі позначення "pS" і "(p)S" означають фосфосериновий амінокислотний залишок. Як використовується в даному описі, антитіло "практично" не здатне зв'язуватися з епітопом, якщо стосовно іншого епітопу таке зв'язування складає менше 20 %, менше 10 %, менше 5 %, менше 2 % і переважніше менше 1 % від зв'язування, спостережуваного для такого іншого епітопу.

Термін "антитіло" (Ab) в контексті цього винаходу відноситься до молекули імуноглобуліну або, згідно з деякими варіантами здійснення цього винаходу, до фрагмента молекули імуноглобуліну, які мають здатність до специфічного зв'язування з епітопом молекули ("антигену"). Антитіла, що зустрічаються в природі, в типовому випадку є тетрамерами, які зазвичай складаються щонайменше з двох важких (H) ланцюгів і щонайменше двох легких (L) ланцюгів. Кожен важкий ланцюг складається з варіабельного домену важкого ланцюга (скорочено званого в даному описі VH) і константного домену важкого ланцюга, що зазвичай складається з трьох доменів (CH1, CH2 і CH3). Важкі ланцюги можуть відноситися до будь-якого ізотипу, включаючи IgG (підтипи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4). Кожен легкий ланцюг складається з варіабельного домену легкого ланцюга (скорочено званого в даному описі VL) і константного домену легкого ланцюга (CL). Легкі ланцюги включають каппа-ланцюги і лямбда-ланцюги. Варіабельний домен важкого і легкого ланцюгів в типовому випадку відповідає за розпізнавання антигену, а константний домен важкого і легкого ланцюгів може опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами реципієнта, в тому числі з різними клітинами імунної системи (наприклад, ефеторними клітинами) і першим компонентом (C1q) класичного шляху активації системи комплементу. VH- і VL-домени можуть додатково підрозділятися на гіперваріабельні домени, звані "ділянками, що визначають комплементарність", які чергуються з доменами з консервативнішою послідовністю та які називаються "каркасними ділянками" (FR). Кожен VH і VL складається з трьох CDR-доменів і чотирьох FR-доменів, розташованих від



аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Особливо відповідними є антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти, які були "виділені" таким чином, щоб вони існували у фізичному середовищі, що відрізняється від середовища, в якому вони можуть зустрічатися в природі, або які були модифіковані так, щоб вони відрізнялися за амінокислотою послідовністю від антитіла, що зустрічається в природі.

Термін "епітоп" означає антигенну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з антитілом. Епітопи зазвичай складаються з поверхневих груп молекул, таких як амінокислоти або цукрові бічні ланцюги, і зазвичай мають специфічні характеристики тривимірної структури, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні і лінійні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, але не з останніми, завжди втрачається у присутності денатуруючих розчинників. Епітоп може містити амінокислотні залишки, що безпосередньо беруть участь у зв'язуванні, і інші амінокислотні залишки, які безпосередньо не беруть участь у зв'язуванні, такі як амінокислотні залишки, що ефективно блокуються пептидом, що специфічно зв'язується з епітопом (іншими словами, амінокислотний залишок знаходиться в межах ділянки розпізнавання для пептиду, що специфічно зв'язується з епітопом).

Використовуваний в даному описі термін "епітопзв'язувальний фрагмент антитіла" означає фрагмент, частину, ділянку або домен антитіла (незалежно від того, як вони отримані (наприклад, шляхом розщеплювання, рекомбінантним шляхом, синтетичним шляхом і т. п.)), які здатні специфічно зв'язуватися з епітопом. Епітопзв'язувальний фрагмент може містити 1, 2, 3, 4, 5 або усі 6 CDR-домени такого антитіла і, не дивлячись на те, що здатний специфічно зв'язуватися з таким епітопом, може проявляти специфічність, афінність або селективність стосовно того епітопу, який відрізняється від епітопу для такого антитіла. Переважно, проте, щоб епітопзв'язувальний фрагмент містив усі 6 CDR-домени такого антитіла. Епітопзв'язувальний фрагмент антитіла може являти собою або містити частину одного поліпептидного ланцюга (наприклад, в scFv) або може являти собою або містити частину двох або більше поліпептидних ланцюгів, кожна з яких має аміно-кінець і карбоксильний кінець (наприклад, в діатілі, Fab-фрагменті, Fab<sub>2</sub>-фрагменті і т.п.). Фрагменти антитіл, які проявляють здатність до зв'язування з епітопом, можна отримати, наприклад, шляхом розщеплювання інтактних антитіл протеазами. Переважніше, щоб, не дивлячись на те, що два домени Fv-фрагмента, VL і VH, в природних умовах кодуються окремими генами, полінуклеотиди, які кодують такі послідовності генів (наприклад, їх кодуючу кДНК), можна було за допомогою рекомбінантних способів з'єднати гнучким лінкером, який забезпечує можливість їх отримання у вигляді одного білкового ланцюга, в якому VL- і VH-ділянки асоційовані одна з одною з утворенням одновалентних епітопзв'язувальних молекул (відомих як одноланцюгові Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883). Як альтернатива, шляхом використання гнучкого лінкера, який є дуже коротким (наприклад, має довжину менш ніж приблизно 9 залишків) для того, щоб забезпечити можливість асоціації VL- і VH-домени одного поліпептидного ланцюга один з одним, можна утворити біспецифічне антитіло, діатіло або аналогічну молекулу (у якій два такі поліпептидні ланцюги асоціюють один з одним з утворенням двовалентної епітопзв'язувальної молекули) (див., наприклад, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) відносно опису діатілу). Приклади епітопзв'язувальних фрагментів, що охоплюються цим винаходом, включають (i) Fab'- або Fab-фрагмент - одновалентний фрагмент, що складається з VL-, VH-, CL- і CH1-домени, або одновалентне антитіло, описане в WO 2007059782; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти - двовалентні фрагменти, що містять два Fab-фрагменти, з'єднані дисульфідним містком в шарнірному домені; (iii) Fd-фрагмент, що по суті складається з VH- і CH1-домени; (iv) Fv-фрагмент, що по суті складається з VL- і VH-домени, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), який по суті складається з VH-домену і також називається доменним антитілом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11): 484-90); (vi) антитіла верблюжих або нанотіла (Reverts et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1): 11-24) і (vii) виділену ділянку, що визначає комплементарність (гіперваріабельну ділянку) (CDR). Додатково, не дивлячись на те, що два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх за допомогою рекомбінантних способів можна з'єднати синтетичним лінкером, який забезпечує можливість їх отримання у вигляді одного білкового ланцюга, в якому VL- і VH-домени знаходяться в парі, з утворенням одновалентних молекул (відомих як одноланцюгові антитіла або одноланцюгові Fv (scFv), див., наприклад, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), і Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Ці і інші фрагменти антитіл, застосовні в контексті цього винаходу, додатково обговорюються в даному описі. Також слід розуміти, що термін "антитіло", якщо не вказане інше, також включає антитілоподібні поліпептиди, такі як химерні антитіла і гуманізовані

антитіла, і фрагменти антитіл, що зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном (епітопзв'язувальні фрагменти), отримувані за допомогою будь-якої відомої методики, такої як ферментативне розщеплювання, синтез пептидів і рекомбінантні методики. Отримане антитіло може мати будь-який ізотип. Як використовується в даному описі, "ізотип" відноситься до класу імунoglobуліну (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), що кодується генами константних доменів важких ланцюгів. Такі фрагменти антитіл отримують за допомогою традиційних методик, відомих фахівцям в даній галузі; відповідні фрагменти, здатні зв'язуватися з бажаним епітопом, можна без зусиль піддати скринінгу відносно корисності таким же чином, як і інтактне антитіло.

Термін "біспецифічне антитіло" відноситься до антитіла, що містить два незалежні епітопзв'язувальні фрагменти, кожен з яких націлюється на незалежні мішені. Ці мішені можуть бути епітопами, присутніми в різних білках, або різними епітопами, присутніми в одній і тій же мішені. Молекули біспецифічних антитіл можна отримувати за допомогою компенсаторних змін амінокислот в константних доменах HC початкових молекул моноспецифічних двовалентних антитіл. Отримане в результаті гетеродимерне антитіло містить один Fab, внесок в утворення якого вносять два різні початкові моноспецифічні антитіла. Зміни амінокислот в Fc-домени приводять до підвищення стабільності гетеродимерного антитіла з біспецифічністю, стабільною за часом. (Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-1 (2010), Moore et al., MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop et al., JMB 420, 204-219 (2012), Metz et al., Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145-5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646-654 (2013)). Біспецифічні антитіла також можуть включати молекули, що отримуються за допомогою злиття scFv. Два моноспецифічні scFv потім незалежно з'єднують з Fc-доменами, здатними утворювати стабільні гетеродимери, з отриманням однієї біспецифічної молекули (Mabry et al., PEDS 23:3 115-127 (2010)). Біспецифічні молекули мають здатності до подвійного зв'язування.

Термін "антитіло D1.2" призначений позначати антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, що має:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 1;
  - (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 2; і
  - (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 3;
- і варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, що має:
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 4;
  - (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 5; і
  - (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 6, або які

складаються з них. У одному варіанті здійснення антитіло D1.2 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 8 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 7 або складатися з них.

У пов'язаному варіанті здійснення антитіло D1.2\* або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 8 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 34 або складатися з них.

Термін "антитіло C10-2" призначений позначати антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, що має:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;
  - (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10; і
  - (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11;
- і варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, що має:
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;
  - (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і
  - (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, або які

складаються з них. У одному варіанті здійснення антитіло C10-2 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 16 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 15 або складатися з них.

У додатковому варіанті здійснення гуманізоване антитіло C10-2 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 35, легкий ланцюг за SEQ ID NO: 36 або їх обидва або складатися з них. Один варіант здійснення цього винаходу направлений на антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що містять важкий ланцюг за SEQ ID NO: 35, легкий ланцюг за SEQ ID NO: 36 або що складаються з них.

Термін "антитіло C5.2" призначений позначати антитіло або його епітопзв'язувальний

фрагмент, що містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, що має:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; і
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19;

5 і варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, що має:

- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22, або що

складаються з них.

10 У одному варіанті здійснення антитіло C5.2 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 24 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 23 або складатися з них.

Термін "антитіло C8.3" призначений позначати антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент його фрагмент, що містять варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, що має:

- 15 (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

і варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, що має:

- 20 (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 30, або що

складаються з них.

У одному варіанті здійснення антитіло C8.3 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 32 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 31 або складатися з

25 них.

"Антитіло до тау-білка" є антитілом або його епітопзв'язувальним фрагментом, що специфічно зв'язуються з тау-білком або фрагментом тау-білка.

Терміни "моноклональне антитіло" або "композиція на основі моноклональних антитіл", використовувані в даному описі, відносяться до препарату з молекул антитіл єдиного молекулярного складу. Традиційна композиція на основі моноклональних антитіл демонструє єдину специфічність зв'язування і афінність до конкретного епітопу. У певних варіантах здійснення моноклональне антитіло може складатися із понад одного Fab-домену з підвищенням таким чином специфічності більш ніж до однієї мішені. Терміни "моноклональне антитіло" або "композиція на основі моноклональних антитіл" не призначені обмежувати будь-яким конкретним способом отримання (наприклад, рекомбінантним, трансгенним, гібридомним і т.п.).

Антитіла за цим винаходом і їх епітопзв'язувальні фрагменти переважно є "гуманізованими", зокрема, якщо вони використовуються для терапевтичних цілей. Термін "гуманізований" відноситься до молекули, що зазвичай отримується за допомогою рекомбінантних методик, яка має епітопзв'язувальну ділянку, отриману з імуноглобуліну від виду, відмінного від людини, і решту структури імуноглобуліну, в основі якої лежить структура і/або послідовність людського імуноглобуліну. Епітопзв'язувальна ділянка може містити або повні варіабельні домени антитіла, відмінного від людського, злиті з людськими константними доменами, або тільки ділянки, що визначають комплементарність (CDR), таких варіабельних доменів, прищеплені до відповідних людських каркасних ділянок людських варіабельних доменів. Залишки каркасних ділянок таких гуманізованих молекул можуть бути дикого типу (наприклад, повністю людськими), або вони можуть бути модифіковані так, щоб містити одну або декілька амінокислотних замін, що не виявляються в людському антитілі, послідовність якого служила як основа для гуманізації. Гуманізація зменшує або усуває вірогідність того, що константний домен молекули діятиме як імуноген у індивідуумів-людей, проте можливість вироблення імунної відповіді на чужорідний варіабельний домен зберігається (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Інший підхід фокусується не тільки на отриманні константних доменів людського походження, але також і на модифікації варіабельних доменів так, щоб реконструювати їх якомога ближче до людської форми. Відомо, що варіабельні домени як важкого, так і легкого ланцюгів містять три ділянки, що визначають комплементарність (CDR), які розрізняються за відповіддю на антигени, що розглядаються, і визначають здатність до зв'язування, фланковані чотирма каркасними ділянками (FR), які є відносно консервативними у даного виду і які імовірно забезпечують остов для CDR. У тих випадках, коли антитіла, відмінні від людських, отримують у відношенні конкретного антигену, варіабельні домени можна

"реконструювати" або "гуманізувати" шляхом трансплантації CDR, що походять від антитіла, відмінного від людського, на FR, що присутні в людському антитілі, яке підлягає модифікації. Про застосування даного підходу до різних антитіл повідомлялося в Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein Engineering* 4:773-783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; i Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", *J. Immunol.* 148:1149-1154. У деяких варіантах здійснення в гуманізованих антитілах зберігаються всі послідовності CDR (наприклад, в гуманізованому мишачому антитілі, яке містить усі шість CDR мишачих антитіл). У інших варіантах здійснення гуманізовані антитіла мають одну або декілька CDR (одну, дві, три, чотири, п'ять, шість), змінених в порівнянні з початковим антитілом, які також називають однією або декількома CDR, "отриманими з" однієї або декількох CDR початкового антитіла. Можливість гуманізації антигену добре відома (див., наприклад, патенти США №№ 5225539; 5530101; 5585089; 5859205; 6407213; 6881557).

Термін "антитіло "XX" призначений позначати антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент (наприклад, антитіло "C10-2"), що містять легкий ланцюг, варіабельний домен легкого ланцюга або CDR1-3 варіабельного домену легкого ланцюга, визначені за їх відповідними SEQ ID NO, і важкий ланцюг, варіабельний домен важкого ланцюга або CDR1-3 варіабельного домену важкого ланцюга, визначені за їх відповідними SEQ ID NO, або що складаються з них. У певних варіантах здійснення антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент визначені повним варіабельним доменом важкого ланцюга, що міститься в них, визначеним за його SEQ ID NO, і варіабельним доменом легкого ланцюга, визначеним за його SEQ ID NO.

Якщо в даному описі не вказане інше, нумерація амінокислотних залишків в Fc-ділянці або константному домені антитіла відповідає системі нумерації EU, яка також називається EU-індексом, яка описана в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Як використовується в даному описі, говорять, що антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент "специфічно" зв'язуються з ділянкою іншої молекули (тобто епітопом), якщо вони реагують або асоціюються з цим епітопом частіше, швидше, з більшою тривалістю і/або з більшою афінністю або авідністю в порівнянні з альтернативними епітопами. Також при прочитанні цього визначення слід розуміти, що, наприклад, антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, які специфічно зв'язуються з першою мішенню, можуть специфічно або переважно зв'язуватися з другою мішенню або можуть не робити цього. Використовуваний в даному описі термін "зв'язування", що застосовується до зв'язування антитіла із попередньо визначеним антигеном, в типовому випадку відноситься до зв'язування з афінністю, відповідною KD, що становить приблизно  $10^{-7}$  М або менше, як, наприклад, приблизно  $10^{-8}$  М або менше, як, наприклад, приблизно  $10^{-9}$  М або менше, при визначенні за допомогою, наприклад, технології поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на приладі BIAcore® 3000 із застосуванням антигену як ліганду і антитіла як аналізованої речовини, і до зв'язування із попередньо визначеним антигеном з афінністю, відповідною KD, щонайменше вдесятеро нижчою, як, наприклад, щонайменше в 100 разів нижчою, наприклад, щонайменше в 1000 разів нижчою, як, наприклад, щонайменше в 10000 разів нижчою, наприклад, щонайменше в 100000 разів нижчою, ніж для його афінності зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїном), відмінним від попередньо визначеного антигену, або близькоспорідненим антигеном. Величина, на яку афінність є нижчою, залежить від KD антитіла, так що якщо KD антитіла є дуже низькою (тобто антитіло є високоспецифічним), то величина, на яку афінність до антигену є нижчою, ніж афінність до неспецифічного антигену, може бути щонайменше 10000-кратною.

Термін "kd" (с-1 або 1/с), використовуваний в даному описі, відноситься до константи швидкості дисоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену. Вказане значення також називають значенням koff.

Термін "ка" ( $M-1 \times c-1$  або  $1/M \cdot c$ ), використовуваний в даному описі, відноситься до константи швидкості асоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену.

Термін "KD" (M), використовуваний в даному описі, відноситься до рівноважної константи дисоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену, отримуваної шляхом ділення  $k_d$  на  $k_a$ .

5 Термін "KA" ( $M-1$  або  $1/M$ ), використовуваний в даному описі, відноситься до рівноважної константи асоціації для конкретної взаємодії антитіла і антигену, отримуваної шляхом ділення  $k_a$  на  $k_d$ .

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до антитіла до тау-білка або його епітопзв'язувального фрагмента, які проявляють одну або декілька наступних властивостей:

- 10 (i) практично відсутню здатність до зв'язування з нефосфорилованим тау-білком;
- (ii) практично відсутню здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S404 і не фосфорилованим в S396;
- (iii) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S396;
- (iv) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим як в S396, так і в S404;
- 15 (v) здатність до селективного розрізнення фосфорилованих залишків S396 і S404 тау-білка, так що вони практично не здатні зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404 (pS404);
- (vi) здатність до зв'язування з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера;
- (vii) здатність до розрізнення патологічного і непатологічного людських тау-білків і/або
- 20 (viii) здатність до специфічного зменшення смуг гіперфосфорилизованого тау-білка розміром 64 кДа і 70 кДа щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуги тау-білка розміром 55 кДа більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей gTg4510 або здатність до специфічного зменшення смуг фосфорилизованого в S396 гіперфосфорилизованого тау-білка щонайменше на 90 % без
- 25 зменшення при цьому смуг негіперфосфорилизованого тау-білка більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами головного мозку людей з AD.

Додатковий варіант здійснення цього винаходу відноситься до антитіла, що отримується за допомогою способу отримання високоспецифічних високоафінних антитіл, які є імуноспецифічними до патогенного гіперфосфорилизованого тау-білка, що містить фосфорилований залишок S396, де вказаний спосіб включає стадії:

(A) проведення ін'єкції імуногена ссавцеві, при цьому вказаний імуноген містить дифосфорилований пептид, що містить 18-40, як, наприклад, 18-30, як, наприклад, 20-30, послідовних амінокислотних залишків, що містять TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVS<sup>(p)</sup>SGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R, з імунізацією таким чином вказаного ссавця;

(B) повторення вказаної імунізації вказаного ссавця два або більше разів;

(C) проведення скринінгу зразка сироватки крові від вказаного багато разів імунізованого ссавця щодо наявності високоспецифічних високоафінних антитіл, здатних зв'язуватися з патогенним гіперфосфорилованим тау-білком, що містить фосфорилований залишок S396, але в значно меншому ступені здатних зв'язуватися з непатогенним тау-білком; і

(D) добування вказаних високоспецифічних високоафінних антитіл.

Як використовується в даному описі, "практично відсутня здатність" до зв'язування з молекулою тау-білка означає більш ніж 20 % різницю, більш ніж 40 % різницю, більш ніж 60 % різницю, більш ніж 80 % різницю, більш ніж 100 % різницю, більш ніж 150 % різницю, більш ніж 2-кратну різницю, більш ніж 4-кратну різницю, більш ніж 5-кратну різницю або більш ніж 10-кратну різницю у функціональних характеристиках в порівнянні з детектовним зв'язуванням, опосередкованим еталонним антитілом.

Терміни "селективний" і "імуноселективний", коли мова йде про здатності до зв'язування, які має антитіло до тау-білка у відношенні двох епітопів, призначені позначати те, що для спостережуваного зв'язування в насичувальних умовах виявляється щонайменше 80 % різниця, щонайменше 95 % різниця і найпереважніше 100 % різниця (тобто відсутність детектовного зв'язування з одним епітопом). Терміни "селективний" і "імуноселективний", коли мова йде про антитіло до тау-білка, додатково призначені позначати те, що антитіло зв'язується з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера і здатне розрізняти патологічний і непатологічний людський тау-білок.

Терміни фракція "що екстрагується в TBS" (S1), фракція "що екстрагується у високосольовому розчині/саркозилі" (S3) і "нерозчинна в саркозилі" фракція (P3) означають фракції, що отримуються за допомогою біохімічного фракціонування тау-білка, описаного в даному описі.

У деяких антитілах тільки частина CDR, а саме підмножина залишків CDR, потрібних для зв'язування, що називається SDR, необхідна для збереження зв'язування в гуманізованому антитілі. Залишки CDR, що не контактують з відповідним епітопом і не містяться в SDR, можна ідентифікувати на підставі попередніх досліджень (наприклад, залишки H60-H65 в H2 CDR часто не потрібні), з ділянок CDR за Kabat, що знаходяться за межами гіперваріабельних петель за Chothia (див. Kabat et al. (1992) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196:901-917), за допомогою молекулярного моделювання і/або емпіричним шляхом або згідно з описаним в Gonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", *Mol. Immunol.* 41:863-872. У таких гуманізованих антитілах в положеннях, в яких відсутні один або декілька залишків донорного CDR або в яких пропущений весь донорний CDR, амінокислота, що займає певне положення, може бути амінокислотою, що займає відповідне положення (згідно з нумерацією за Kabat) в акцепторній послідовності антитіла. Кількість таких заміन акцепторних амінокислот на донорні в CDR, які потрібно включити, відображає баланс альтернативних думок. Такі заміни є потенційно переважними для зниження кількості мишачих амінокислот в гуманізованому антитілі і зниження внаслідок цього потенційної імуногенності. Проте, заміни також можуть обумовлювати зміни афінності, і переважно уникають значного зменшення значень афінності. Положення для заміни в межах CDR і амінокислоти, необхідні для заміни, також можна вибрати емпіричним шляхом.

Той факт, що зміна однієї амінокислоти в залишку CDR може приводити до втрати функціонального зв'язування (Rudikoff, S. etc... (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79(6):1979-1983), забезпечує можливість систематичної ідентифікації альтернативних функціональних послідовностей CDR. У одному переважному способі отримання таких варіантів CDR полінуклеотид, що кодує CDR, піддають мутагенезу (наприклад, за допомогою випадкового мутагенезу або за допомогою сайт-спрямованого способу (наприклад, ампліфікації, опосередкованої полімеразною ланцюговою реакцією, з праймерами, що кодують мутантний локус)) з отриманням CDR, що має замінений амінокислотний залишок. Шляхом порівняння за відповідним залишком ідентичності початкової (функціональної) послідовності CDR з ідентичністю варіанта послідовності CDR із заміною (нефункціональної) для цієї заміни можна визначити вагу заміни згідно з BLOSUM62.ijj. У системі BLOSUM представлена матриця амінокислотних заміни, що створюється шляхом аналізу бази даних послідовностей відносно достовірних вирівнювань (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. В даний час найбільш досконалою базою даних BLOSUM є база даних BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). У таблиці 1 представлені значення ваги заміни згідно з BLOSUM62.ijj (чим більша вага, тим більш консервативною є заміна і, таким чином, тим більш ймовірно, що заміна не впливатиме на функцію). Якщо епітопзв'язувальний фрагмент, що містить отриману в результаті CDR, не може зв'язуватися з тау-білком, наприклад, то вважають, що вага заміни згідно з BLOSUM62.ijj свідчить про її недостатню консервативність, і вибирають і проводять нову заміну-кандидата, що має більшу вагу заміни. Таким чином, наприклад, якщо початковим залишком був глутамат (E), а нефункціональним замінюючим залишком був гістидин (H), то вага заміни згідно з BLOSUM62.ijj дорівнювала 0, і консервативніші зміни (як, наприклад, на аспартат, аспарагін, глутамін або лізин) є переважними.

Таблиця 1

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

5 Цей винахід, таким чином, припускає застосування випадкового мутагенезу для ідентифікації покращених CDR. У контексті цього винаходу консервативні заміни можуть бути визначені як заміни в межах класів амінокислот, відображених в одній або декількох з таблиць 2, 3 або 4.

Класи амінокислотних залишків для консервативних замін

Таблиця 2

Кислі залишки	Asp (D) і Glu (E)
Основні залишки	Lys (K), Arg (R) і His (H)
Гідрофільні незаряджені залишки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) і Gln (Q)
Аліфатичні незаряджені залишки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) і Ile (I)
Неполярні незаряджені залишки	Cys (C), Met (M) і Pro (P)
Ароматичні залишки	Phe (F), Tyr (Y) і Trp (W)

10 Альтернативні класи амінокислотних залишків для консервативних замін

Таблиця 3

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

## Альтернативні фізичні і функціональні класифікації амінокислотних залишків

Таблиця 4

Залишки, що містять спиртову групу	SiT
Аліфатичні залишки	I, L, ViM
Залишки, зв'язані з циклоалкенілом	F, H, WiY
Гідрофобні залишки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, WiY
Негативно заряджені залишки	DiE
Полярні залишки	C, D, E, H, K, N, Q, R, SiT
Позитивно заряджені залишки	H, KiR
Маленькі залишки	A, C, D, G, N, P, S, TiV
Дуже маленькі залишки	A, GiS
Залишки, що беруть участь в утворенні вигину	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, PiT
Гнучкі залишки	Q, T, K, S, G, P, D, EiR

5 Групи консервативніших замінів включають валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін і аспарагін-глутамін.

Додаткові групи амінокислот також можуть бути складені з використанням принципів, описаних, наприклад, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

10 Як альтернативу можна застосовувати технологію фагового дисплея для підвищення (або зниження) афінності CDR. У цій технології, званій дозріванням афінності, використовується мутагенез або "прогулянка по CDR" і повторний відбір із застосуванням антигену-мішені або його антигенного епітопу зв'язувального фрагмента для ідентифікації антитіл, що мають CDR, які зв'язуються з вищою (або нижчою) афінністю з антигеном в порівнянні з первинним або початковим антитілом (див., наприклад, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Мутагенез

15 цілих кодонів, а не окремих нуклеотидів, приводить до отримання напіввипадкового набору амінокислотних мутацій. Можна конструювати бібліотеки, що складаються з пулу варіантів клонів, кожен з яких відрізняється однією зміною амінокислоти в одній CDR, який також містить варіанти, що представляють кожну можливу амінокислотну заміну для кожного залишку CDR. Мутантні форми з підвищеною (або зниженою) афінністю зв'язування з антигеном можна

20 піддати скринінгу шляхом приведення іммобілізованих мутантних форм в контакт з міченим антигеном. Можна застосовувати будь-який спосіб скринінгу, відомий з рівня техніки, для ідентифікації мутантних антитіл з підвищеною або зниженою афінністю до антигену (наприклад, ELISA) (див. Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Можливо також застосовувати прогулянку по CDR, в ході якої легкий ланцюг піддається випадковому мутагенезу (див. Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551).

Способи виконання такого дозрівання афінності описані, наприклад, в Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes", *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41", *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For ANTI-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009)

30 "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification", *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; i Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034.

45 Таким чином, послідовність варіантів CDR охоплюваних антитілом або їх епітопозв'язувальних фрагментів може відрізнятися від послідовності CDR початкового антитіла D1.2, C10-2, C5.2 або C8.3 завдяки замінам; наприклад, замінені 4 амінокислотним залишком, 3 амінокислотним



залишкам, 2 амінокислотним залишкам або 1 амінокислотному залишку. Згідно з варіантом здійснення цього винаходу додатково передбачається, що амінокислоти в CDR-ділянках можна замінювати за допомогою консервативних замінів, визначених в 3 таблицях вище. Наприклад, кислий залишок Asp можна замінити на Glu без значного впливу на характеристики зв'язування антитіла.

Термін "нормальний тау-білок" відноситься до нормального тау-білка головного мозку, що містить 2-3 моля фосфату на моль білка.

Термін "гіперфосфорилований тау-білок" відноситься до поліфосфорилованих молекул тау-білка, відповідних індукованому поліаніонними молекулами зсуву рухливості у вестерн-блотингу, або до молекул тау-білка, що мають більше п'яти, шести або семи фосфорилованих серинових, треонінових або тирозинових сайтів.

Термін "тау-білок, що має фосфорилований залишок 396" відноситься до гіперфосфорилизованого тау-білка, в якому залишок 396 є фосфорилованим, а залишок 404 є фосфорилованим або не є фосфорилованим.

Термін "трансгенна тварина, відмінна від людини" відноситься до тварини, відмінної від людини, що має геном, що містить один або декілька людських трансгенів або трансхромосом, що кодують важкий і/або легкий ланцюг (інтегрованих або не інтегрованих в природну геномну ДНК тварини), яка здатна експресувати повністю гуманізовані антитіла. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген, що кодує гуманізований легкий ланцюг, і або трансген, що кодує гуманізований важкий ланцюг, або трансхромосому, що кодує гуманізований важкий ланцюг, так що у миші виробляється гуманізоване антитіло до тау-білка при імунізації антигенним тау-білком і/або клітинами, що експресують тау-білок. Трансген, що кодує гуманізований важкий ланцюг, може бути інтегрований в хромосомну ДНК миші, як у випадку з трансгенними мишами, наприклад, мишами NuMAb, такими як миші HCo7 або HCo12, або трансген, що кодує гуманізований важкий ланцюг, може зберігатися позахромосомно, як у випадку з трансхромосомними мишами KM, описаними в WO 02/43478. Такі трансгенні і трансхромосомні миші (в сукупності називаються в даному описі "трансгенними мишами") здатні виробляти декілька ізотипів гуманізованих моноклональних антитіл до даного антигену (таких як IgG, IgA, IgM, IgD і/або IgE), що піддаються V-D-J-рекомбінації і перемиканню ізотипу.

Трансгенну тварину, відмінну від людини, також можна використовувати для отримання антитіл до специфічного антигену шляхом введення генів, що кодують таке специфічне антитіло, наприклад, шляхом формування функціонального зв'язку генів з геном, що експресується в молоці тварини.

Термін "лікування" або "здійснення лікування", використовуваний в даному описі, означає полегшення, уповільнення, ослаблення або усунення прогресу або тяжкості захворювання або порушення або полегшення, уповільнення, ослаблення або усунення одного або декількох симптомів або побічних ефектів такого захворювання або порушення. Для цілей цього винаходу "лікування" або "здійснення лікування" додатково означає підхід для отримання сприятливих або бажаних клінічних результатів, де "сприятливі або бажані клінічні результати" включають, без обмеження, часткові або повні, що виявляються або не виявляються, зменшення інтенсивності прояву симптому, зниження ступеня тяжкості порушення або захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання або порушення, затримку або уповільнення прогресу стану захворювання або порушення, полегшення або пом'якшення стану захворювання або порушення і ремісію захворювання або порушення.

"Ефективна кількість", вживана стосовно антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента за цим винаходом, відноситься до кількості, яка при введенні в необхідних дозах і протягом необхідних періодів часу є достатньою для досягнення наміченого біологічного ефекту або бажаного терапевтичного результату, в тому числі, без обмеження, клінічних результатів. Фраза "терапевтично ефективна кількість", вживана стосовно антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента за цим винаходом, призначена позначати кількість антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента, яка є достатньою для полегшення, пом'якшення, стабілізації, усунення, уповільнення, ослаблення або затримки прогресу стану порушення або захворювання або симптому порушення або захворювання. У варіанті здійснення спосіб за цим винаходом передбачає введення антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента в комбінаціях з іншими сполуками. У таких випадках "ефективною кількістю" є кількість комбінації, достатня для того, щоб викликати намічений біологічний ефект.

Терапевтично ефективна кількість антитіла до тау-білка або його епітопзв'язувального фрагмента за цим винаходом може варіюватися залежно від таких чинників, як стан захворювання, вік, стать і маса індивідуума, а також від здатності антитіла до тау-білка або його епітопзв'язувального фрагмента викликати бажану відповідь у індивідуума. Терапевтично

ефективною також є така кількість, при якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти антитіла або частини антитіла переважаються терапевтично сприятливими ефектами.

Як вказано вище, цей винахід, зокрема, відноситься до моноклональних антитіл або їх епітопзв'язувальних фрагментів і до абсолютно нового способу отримання таких молекул (і, отже, таких їх епітопзв'язувальних фрагментів). Цей спосіб у загальних рисах представлений на фігурі 9. Ця можливість виділяти моноклональні антитіла за допомогою нового способу представлена в даному описі на прикладі його застосування для виділення моноклональних антитіл, здатних специфічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком серином-396 (<sup>(p)</sup>S396) людського тау-білка (SEQ ID NO: 33). Ці антитіла додатково характеризуються своєю здатністю розрізняти фосфориловані залишки серин-396 і серин-404 (pS404), так що вони не зв'язуються з тау-білком з фосфорилованим серином 404, за винятком випадків, коли тау-білок також фосфорилований по залишку 396.

Антитіла за цим винаходом або їх епітопзв'язувальний фрагмент були отримані і виділені шляхом застосування нового способу (фігура 9), який сприяє відбору <sup>(p)</sup>S396-специфічних антитіл (фігура 9). Додатково, за допомогою застосування цієї вельми строгої процедури відбору клонів антитіл були отримані антитіла, які є не тільки високоспецифічними відносно S396, але також і високоселективними відносно фосфорилизованого епітопу <sup>(p)</sup>S396. Ці антитіла унікальним чином розпізнають тау-білки з головного мозку з хворобою Альцгеймера. Автори цього винаходу також демонструють, що процедура скринінгу, представлена у загальних рисах на фігурі 9, забезпечує ідентифікацію антитіл, що мають функціональну і терапевтичну корисність.

Індукували вироблення антитіл до дифосфорилизованого пептиду TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVSGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-408 тау-білка 2N4R (приклад 1). Мишей імунізували цим фосфорилованим пептидом. Після отримання достатніх титрів антитіл мишей убивали і отримували гібридами (приклад 2). Гібридами піддавали скринінгу за допомогою дот-блот-аналізу (приклад 3) і MSD-ELISA з іммобілізованим патологічним і непатологічним людським тау-білком (приклад 4). Здатність до розрізнення патологічного і непатологічного людських тау-білків застосовували в ході дот-блот-аналізу і вестерн-блот-аналізу для відбору гібридом. Відбирали шістнадцять клонів, з яких добували чотири гібридомні клони, які виробляли антитіла, що характеризуються надзвичайно високими здатностями до зв'язування з патологічним матеріалом людського тау-білка.

Специфічне зв'язування з патологічним і непатологічним тау-білком також визначали шляхом виділення тау-білка з ураженого захворюванням головного мозку людей з AD і не ураженого захворюванням головного мозку і іммобілізації цього матеріалу на планшетах для MSD-ELISA (приклад 4).

Додатковий аспект цього винаходу відноситься до моноклонального антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента, утворення яких відбувається у відповідь на дифосфорилований пептид, що містить щонайменше 18, як, наприклад, щонайменше 20, послідовних амінокислотних залишків в межах TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVSGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R. У цьому аспекті цього винаходу утворення моноклонального антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента в типовому випадку викликається у відповідь на дифосфорилований пептид, що містить 18-40, як, наприклад, 18-30, як, наприклад, 20-30, послідовних амінокислотних залишків, що містять TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVSGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R.

Додатковий аспект цього винаходу направлений на моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за цим винаходом, що мають специфічність у відношенні фосфорилизованого тау-білка (pTau) від пацієнтів, уражених AD, в порівнянні із здоровими контрольними суб'єктами у відповідній віковій групі, так що вказані моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент характеризуються різницею в специфічності стосовно фосфорилизованого тау-білка (pTau) від пацієнтів, уражених AD, в порівнянні з тау-білком від контрольних суб'єктів у відповідній віковій групі здорових людей, що являє собою більш ніж 50-кратне, як, наприклад, більш ніж 100-кратне підвищення специфічності стосовно матеріалу, ураженого AD, в порівнянні з матеріалом від здорових контрольних суб'єктів в заснованому на аналізі ELISA для виявлення фосфорилизованого тау-білка (pTau) в гомогенатах головного мозку від уражених AD і від здорових контрольних суб'єктів із застосуванням специфічної схеми 1 ELISA для фосфорилованих і мультимерних молекул, як описано в даному описі.

Пов'язаний аспект цього винаходу направлений на моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за цим винаходом, що мають специфічність до тау-білка з матеріалу, ураженого AD, так що вказані моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний

фрагмент характеризуються різницею в специфічності у відношенні матеріалу, ураженого AD, в порівнянні з матеріалом від контрольних суб'єктів у відповідній віковій групі здорових людей, що являє собою більш ніж 50-кратне, як, наприклад, більш ніж 100-кратне підвищення специфічності у відношенні матеріалу, ураженого AD, в порівнянні з матеріалом від здорових контрольних суб'єктів в заснованому на аналізі ELISA для виявлення фосфорилованого тау-білка (pTau) в гомогенатах головного мозку від уражених AD і від здорових контрольних суб'єктів із застосуванням специфічної схеми 1 ELISA для фосфорилованих і мультимерних молекул.

Спосіб виконання схеми 1 ELISA включає стадії: А) захоплення патологічних антигенних людських тау-білків з головного мозку з AD за допомогою планшетів, покритих C10-2; В) інкубування антигенних тау-білків з pS396-специфічними антитілами в концентраціях, що підвищуються, і С) виявлення захоплення антигенних тау-білків і його антитілоопосередкованого інгібування за допомогою антитіл до людського (загального) тау-білка від MSD, мічених SULFO-TAG.

Цей винахід додатково відноситься до антитіла, що отримується за допомогою способу отримання високоспецифічних високоафінних антитіл, які є імуноспецифічними до патогенного гіперфосфорилованого тау-білка, що містить фосфорилований залишок S396, де вказаний спосіб включає стадії:

(А) проведення ін'єкції імуногена ссавцеві, при цьому вказаний імуноген містить дифосфорилований пептид, що містить 18-40, як, наприклад, 18-30, як, наприклад, 20-30, послідовних амінокислотних залишків, що містять TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVS<sup>(p)</sup>SGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R, з імунізацією таким чином вказаного ссавця;

(В) повторення вказаної імунізації вказаного ссавця два або більше разів;

(С) проведення скринінгу зразка сироватки крові від вказаного імунізованого багато разів ссавця у відношенні наявності високоспецифічних високоафінних антитіл, здатних зв'язуватися з патогенним гіперфосфорилованим тау-білком, що містить фосфорилований залишок S396, але в значно меншому ступені здатних зв'язуватися з непатогенним тау-білком; і

(D) добування вказаних високоспецифічних високоафінних антитіл.

Конкретніше, стадія А включає: покриття планшетів MSD (у типовому випадку протягом ночі при 4 С) антитілом C10-2, в типовому випадку при 0,5 мкг/мл (захоплюючим антитілом) в покриваючому буфері, блокування (у типовому випадку протягом 1 години при кімнатній температурі) і промивання, в типовому випадку 3 рази. Стадія В включає: змішування зразків лізату РЗ (у типовому випадку при 1:1000=2-4 мкг/мл загального білка) і/або S1(p) (у типовому випадку при 1:300=20-40 нг/мл загального білка) з матеріалу від суб'єктів з AD (об'єднаного від 3 пацієнтів) з антитілом, специфічним до пептидного епітопу pS396, в концентраціях, що ступінчасто змінюються, і інкубування (у типовому випадку протягом 1 години при кімнатній температурі). Реакційні суміші потім інкубують протягом 2 годин на планшетах, підготовлених на стадії А. Стадія С включає виявлення тау-білка, захопленого C10-2, за допомогою антитіла до людського тау-білка, міченого SULFO-TAG. Антитіло до тау-білка (у типовому випадку 1:50) від MSD, відповідне інструкціям виробника. Планшети аналізують на SECTOR® S600 від MSD. РЗ з матеріалу з AD і S1(p) з матеріалу з AD тестують згідно з аналогічною схемою.

Додатковий варіант здійснення направлений на антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33), які були отримані або вироблені в клітинній лінії, такій як клітинна лінія людини, клітинна лінія ссавця, відмінного від людини, клітинна лінія комахи, дріжджів або бактерії.

Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33), отримують в клітинній лінії CHO, клітинній лінії НЕК, клітинній лінії ВНК-21, клітинній лінії миші (такій як клітинна лінія мієломи), клітинній лінії фібросаркоми, клітинній лінії PER.C6, клітинній лінії НКВ-11, клітинній лінії CAP і клітинній лінії людини HuH-7.

Характеристики специфічної афінності і властивостей зв'язування D1.2 і C10-2 отримували із застосуванням пептидів 386-410 тау-білка (2R4N), фосфорилованих або не фосфорилованих в положенні 396 або 404 (SEQ ID NO: 29-32). Шляхом застосування специфічного протоколу імунізації і скринінгу (фігура 9), у загальних рисах представленого в цій заявці, отримують високоспецифічні антитіла до фосфосерину-396 (pS396), як продемонстровано на фігурі 4.

Щоб продемонструвати, що антитіла є специфічними відносно патологічного тау-білка, також отримували характеристики антитіл D1.2 і C10-2 за допомогою імуногістохімічного аналізу (приклад 6). Антитіла проявляють високоспецифічне зв'язування з нейрофібрилярними

клубками в головному мозку і в зрізах з хворобою Альцгеймера від трансгенних по тау-білку мишей Tg4510, що експресують людський (P301L) мутантний тау-білок (фігура 5). Зв'язування з тканиною з контрольного головного мозку людей і з головного мозку нетрансгенних мишей не спостерігається, що демонструє, що антитіла специфічно зв'язуються з людським тау-білком і, зокрема, з тау-білком, що асоціюється з альцгеймеровською патологією.

Унікальна здатність цих антитіл до розпізнавання тау-білка, що асоціюється з хворобливою патологією, продемонстрована в даному описі в прикладі 7. Автори цього винаходу порівнюють зв'язування патологічного і непатологічного тау-білка в аналізі, описаному в прикладі 3. Порівняння проводять стосовно п'яти опублікованих антитіл до тау-білка: hACI-2B6, IPN002, HJ8.5, 2.10.3 і 4E4. На фігурі 6 проілюстровано зв'язування кожного з еталонних антитіл з тау-білком із здорового і ураженого захворюванням головного мозку і зв'язування з людським тау-білком з мутацією P301L, виділеним з мишей Tg4510 у віці 10 місяців, трансгенних по тау-білку. Це демонструє, що виділені антитіла демонструють виключно високий ступінь специфічності і селективності стосовно людського патологічного тау-білка. Ця селективність перевершує селективність будь-якого з порівнюваних антитіл, як показано в таблиці 5.

Таблиця 5

mAb, що тестують	AD/контроль	TG/wt
hACI-2B6	3	1
IPN002	3	37
HJ8.5	3	51
4E4	зв'язування відсутнє	1
2.10.3	5	2
C5-2_C10-2	>100	118

При насичувальному зв'язуванні антитіла D1.2 і C10-2 проявляють більш ніж 100-кратну селективність у відношенні тау-білка P3, виділеного з головного мозку людей з AD.

Щоб продемонструвати, що відібрані антитіла мають функціональну і терапевтичну корисність, антитіла тестували в аналізах агрегації тау-білка *in vitro* і в клітині (приклад 8). Цими аналізами є функціональні аналізи, в яких демонструється, що антитіла здатні перешкоджати процесу патологічної агрегації тау-білка. Клітини HEK293 транз'єнтно трансфікують людським тау-білком P301L-FLAG (4R0N). Потім клітини піддають дії екстрактів тау-білка з головного мозку людей з AD або з головного мозку трансгенних Tg4510. Ця дія патологічного тау-білка сприяє поглинанню тау-білка клітинами і його внутріклітинній агрегації. Як імуновиснаження препаратів тау-білка за допомогою антитіл D1.2 і C10-2, так і безпосередня обробка клітин цими антитілами здатні забезпечувати істотне зменшення утворення агрегатів тау-білка (фігура 7).

Терапевтичну корисність антитіл D1.2 і C10-2 також оцінювали у мишей, що експресують людський тау-білок/PS1 (приклад 9). Ця мишача модель є більш відповідною тваринною моделлю захворювання AD, в якій патологія AD утворюється лише в пізньому віці (у віці 12-18 місяців). Проте, у мишей виявляється гіперфосфорилювання тау-білка до появи патології щільних клубків. Мишам ін'єктували дозу 15 мг/кг двічі на тиждень протягом тривалого періоду 13 тижнів. У мишей, оброблених антитілом, виявляється істотне зменшення рівня фосфорилюваного тау-білка, продемонстроване на фігурі 9, що указує на те, що при тривалій обробці антитілами D1.2 і C10-2 зменшуватиметься клубкова патологія і, таким чином, подальша нейродегенерація *in vivo*.

Антитіла за цим винаходом специфічно видаляють гіперфосфорилюваний тау-білок з екстрактів головного мозку мишей rTg4510 за допомогою способів імуновиснаження. Крім того, антитіла за цим винаходом не видаляють нормальний тау-білок з гомогенатів, тоді як комерційно доступне антитіло Tau5 робить це. На відміну від комерційних антитіл, що зв'язуються з тау-білками, в яких має місце фосфорилювання по залишку 404 або як по залишку 404, так і по залишку 396, антитіла за цим винаходом специфічно видаляють на 95 % гіперфосфорилюваний тау-білок, який фосфорилюваний по серину-396. Експерименти (приклад 12) демонструють, що не дивлячись на те, що антитіло за цим винаходом видаляє лише дуже невелику частку загального тау-білка в гомогенаті головного мозку (8 %), антитіла, проте, специфічно видаляють гіперфосфорилюваний тау-білок (на 90 %). Відповідно, один аспект цього винаходу направлений на моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з патогенним гіперфосфорилюваним тау-білком. Додатково, в експериментах, в яких гіперфосфорилюваний тау-білок видаляли за допомогою антитіла за цим винаходом, усувається активність затравлювальної дії. При видаленні

гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індукують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка. Було висунуто припущення, що при зменшенні затравлювальної дії зменшується розвиток утворення клубків і прогрес таупатій, включаючи хворобу Альцгеймера. Відповідно, додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло

за цим винаходом для застосування в зменшенні прогресу AD або інтенсивності симптомів AD. Конкретніше, як детально описано вище, цей винахід відноситься до будь-якого з чотирьох моноклональних антитіл, вибраних з групи, що включає:

#### Антитіло D1.2

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 1;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 2;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 3;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 4;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 5; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 6.

Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 8 і/або варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 7 або складатися з них.

У пов'язаному варіанті здійснення антитіло D1.2 або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити важкий ланцюг за SEQ ID NO: 8 і/або легкий ланцюг за SEQ ID NO: 34 або складатися з них.

#### Антитіло C10-2

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14.

Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 15 і/або варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 16 або складатися з них.

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга гуманізованого антитіла C10-2 показана під SEQ ID NO: 35. Амінокислотна послідовність легкого ланцюга гуманізованого антитіла C10-2 показана під SEQ ID NO: 36.

В сукупності приклади показують, що антитіла за цим винаходом, зокрема C10-2, ефективно зв'язуються з планшетами MSD, покритими антигенами AD-P3. Для порівняння, комерційні антитіла, такі як PHF-13, мають низьку активність зв'язування. Додатково, PHF-13 демонструвало значно вищий ступінь неспецифічного зв'язування в порівнянні з антитілами за цим винаходом (див. таблиці 6A-6D). У таблиці 6 показано, що рідиннофазне інгібування mC10-2 захоплення антигену рТау в планшеті, покритому C10-2, є ефективним (IC<sub>50</sub>=10-20 нМ), тоді як у випадку з mD1.2 воно є неефективним (IC<sub>50</sub>=500-1000 нМ). Рідиннофазне інгібування mC10-2 захоплення антигену рТау в планшеті, покритому mC10-2, є ефективним при IC<sub>50</sub>=10-20 нМ, тоді як у випадку з PHF-13 воно є неефективним (IC<sub>50</sub>=500-1000 нМ).

Один аспект цього винаходу направлений на антитіло, що містить:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11.

Додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло, що містить:

- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14.

Додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло, що містить:

- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, а також

одну, дві або три з

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10; і
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11.

#### Антитіло C5.2

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17;

- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22.

Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 23 і/або варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 24 або складатися з них.

Як можна бачити з кристалічної структури на фігурі 10, епітоп зв'язується між важким ланцюгом і легкими ланцюгами C5.2. Відповідно, в пов'язаному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальний фрагмент містять:

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17; або
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; або
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19; і
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20; або
- (d) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; або
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22.

Антитіло C8.3

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26;
- (c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;
- (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28;
- (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29; і
- (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 30.

Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити варіабельний домен важкого ланцюга за SEQ ID NO: 31 і/або варіабельний домен легкого ланцюга за SEQ ID NO: 32 або складатися з них.

Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент переважно є людським або гуманізованим антитілом.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти, згадані вище, згідно з одним варіантом здійснення, можуть додатково містити варіант такої CDR1, CDR2 або CDR3 легкого і/або важкого ланцюга (не більше ніж з 4 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж з 3 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж з 2 відмінностями в амінокислотах, або не більше ніж з 1 відмінністю в амінокислотах).

Як можна бачити з фігури 11, CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC і CDR3 LC щонайменше в одному варіанті здійснення важливі для зв'язування з ділянкою 392-398 тау-білка. У одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальний фрагмент містять:

- а) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 28;
- б) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21 і SEQ ID NO: 29; і
- с) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22 і SEQ ID NO: 30; і
- д) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 27.

Антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальний фрагмент можуть містити:

- а) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20;
- б) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21;
- с) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22; і
- д) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19.

У одному аспекті цього винаходу цей винахід направлений на антитіло або його епітопзв'язувальні фрагменти, що утворюють гідрофобну кишеню, утворену L3:H3, L3:F8\*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 з Y394 пептиду тау-білка. У варіанті здійснення цей винахід направлений на антитіло, яке конкурує з антитілом, додатково описаним в даному описі, за утворення мережі водневих зв'язків між сольватованим <sup>(p)</sup>S396 і L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3; (\*) L3:F8 являє собою С-кінцевий залишок каркасної ділянки, фланкуючий CDR L3 (див. фігуру 11).

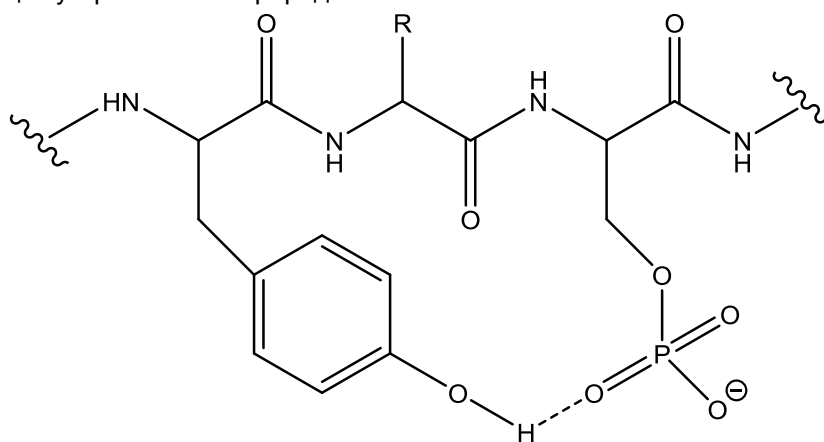
Як можна бачити з кристалічної структури, визначеної за допомогою рентгенографічного аналізу, антитіло за цим винаходом зв'язується на двох рівнях селективності. Першим рівнем селективності є селективність стосовно гіперфосфорилизованого патологічного тау-білка, а

другим рівнем селективності є селективність стосовно фосфорилизованого серинового залишку, де фосфат вказаного фосфорилизованого серину зв'язаний водневим зв'язком з бічним ланцюгом тирозинового залишку, віддаленого на два залишки від вказаного фосфорилизованого серину. Відповідно, аспект цього винаходу, що представляє інтерес, направлений на антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, селективні стосовно амінокислотного мотиву гіперфосфорилизованого тау-білка, що містить фосфорилований серин, віддалений на два залишки від тирозинового залишку. У типовому випадку цей амінокислотний мотив має наступну послідовність:

Y-X - S(фосфорилований) - P -

де Y являє собою тирозин, X являє собою амінокислоту, що зустрічається в природі, P являє собою пролін, а S(фосфорилований) являє собою серин з фосфорилованою гідроксильною групою бічного ланцюга.

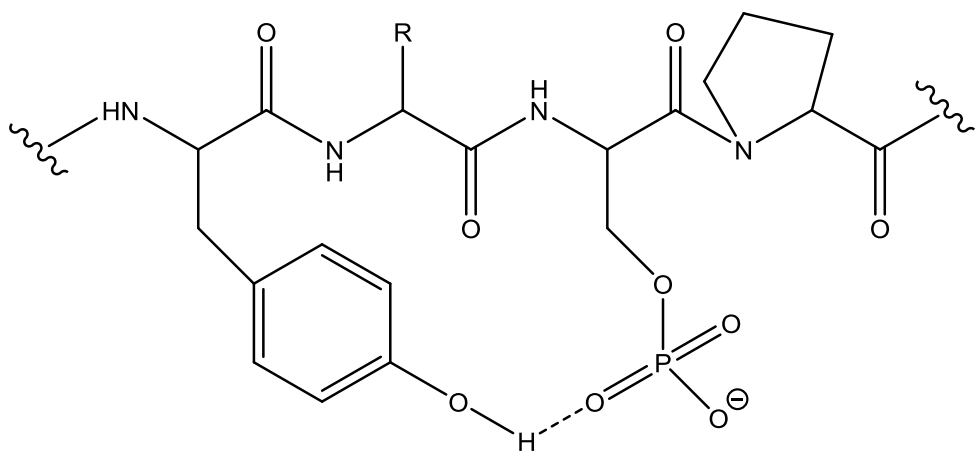
Так само, аспект цього винаходу, що представляє інтерес, направлений на антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, які зв'язуються з фосфорилованим тау-білком, переважно з гіперфосфорилованим тау-білком, де вказані антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент є селективними стосовно мотиву IA з амінокислотних залишків, де R є бічним ланцюгом амінокислоти, що зустрічається в природі.



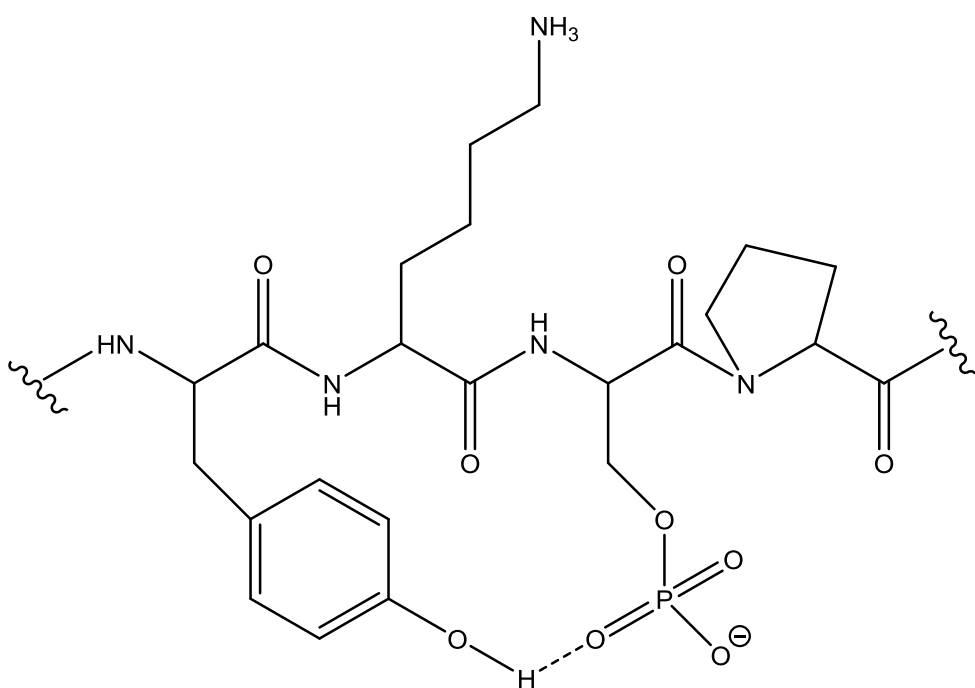
IA

Без обмеження будь-якою конкретною теорією вважають, що антитіло за цим винаходом є селективним стосовно амінокислотного мотиву IA, де вказаний мотив має конформацію, яку приймає патологічний тау-білок. Відповідно, амінокислотний мотив IA в типовому випадку є послідовністю, селективно розпізнаваною антитілом за цим винаходом. Відповідно, аспект цього винаходу, що представляє інтерес, направлений на антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, які зв'язуються з фосфорилованим тау-білком, переважно з гіперфосфорилованим тау-білком, де вказані антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент є селективними стосовно мотиву IB з амінокислотних залишків, де R є бічним ланцюгом амінокислоти, що зустрічається в природі.

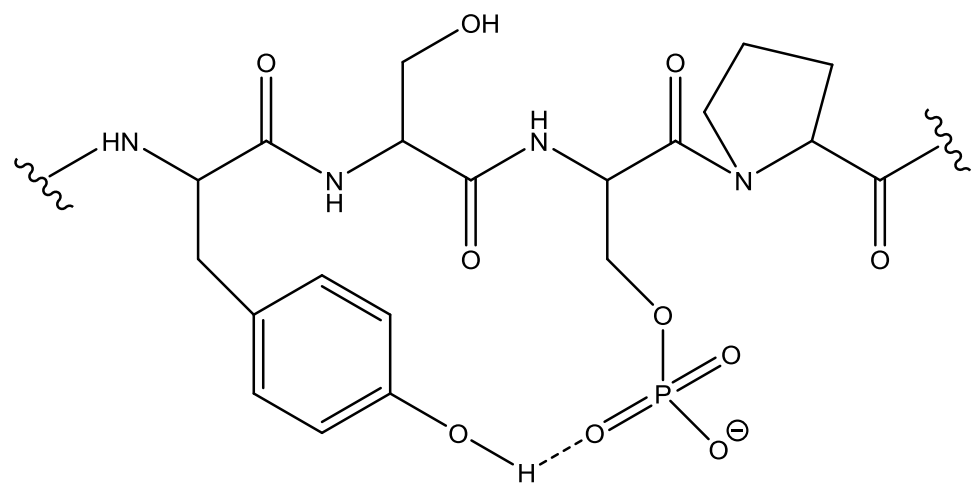
У типовому варіанті здійснення даного аспекту цього винаходу цей винахід направлений на антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, які зв'язуються з фосфорилованим тау-білком, переважно з гіперфосфорилованим тау-білком, де вказані антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент є селективними стосовно мотиву IB з амінокислотних залишків, такого як, без обмеження, IC або ID, де R є бічним ланцюгом амінокислоти, що зустрічається в природі.



IB



IC



ID



Цей винахід також передбачає спосіб зменшення утворення клубків тау-білка у пацієнта, який включає введення пацієнтові, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом або його епітопзв'язувальних фрагментів.

Один аспект цього винаходу направлений на спосіб лікування таупатії за допомогою антитіла за цим винаходом або його епітопзв'язувальних фрагментів. У типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD), хвороби Піка, первинної вікової таупатії (PART), сенільної деменції з домінантою нейрофібрилярних клубків, деменції боксерів, хронічної травматичної енцефалопатії, інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона, паркінсонізму, зчепленого з хромосомою, хвороби Літкіо-Бодіга (гуамського комплексу паркінсонізм-деменція), гангліогліоми і гангліоцитомі, менингоангіоматозу, постенцефалітичного паркінсонізму, підгострого склерозуючого паненцефаліту, хвороби Хантінгтона, свинцевої енцефалопатії, туберозного склерозу, хвороби Галлервордена-Шпатца і ліпофусцинозу. У більш типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD) і хвороби Піка. Зокрема, таупатії можуть бути вибрані з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD і психіатричними симптомами у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві.

Відповідно, додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальні фрагменти для застосування в лікуванні таупатії. У типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD), хвороби Піка, первинної вікової таупатії (PART), сенільної деменції з домінантою нейрофібрилярних клубків, деменції боксерів, хронічної травматичної енцефалопатії, інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона, паркінсонізму, зчепленого з хромосомою, хвороби Літкіо-Бодіга (гуамського комплексу паркінсонізм-деменція), гангліогліоми і гангліоцитомі, менингоангіоматозу, постенцефалітичного паркінсонізму, підгострого склерозуючого паненцефаліту, хвороби Хантінгтона, свинцевої енцефалопатії, туберозного склерозу, хвороби Галлервордена-Шпатца і ліпофусцинозу. У більш типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD) і хвороби Піка. Зокрема, таупатії можуть бути вибрані з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD і психіатричними симптомами у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві.

Додатковий аспект цього винаходу направлений на антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальні фрагменти в композиції разом з фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем, допоміжним засобом і/або стабілізатором. Антитіла за цим винаходом або їх епітопзв'язувальні фрагменти можна застосовувати в терапії для лікування таупатії. У типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD), хвороби Піка, первинної вікової таупатії (PART), сенільної деменції з домінантою нейрофібрилярних клубків, деменції боксерів, хронічної травматичної енцефалопатії, інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона, паркінсонізму, зчепленого з хромосомою, хвороби Літкіо-Бодіга (гуамського

комплексу паркінсонізм-деменція), гангліогліоми і гангліоцити, менінгоангіоматозу, постенцефалітичного паркінсонізму, підгострого склерозуючого паненцефаліту, хвороби Хантінгтона, свинцевої енцефалопатії, туберозного склерозу, хвороби Галлервордена-Шпатца і ліпофусцинозу. У більш типовому випадку таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), ТБІ (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD) і хвороби Піка. Зокрема, таупатії можуть бути вибрані з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD і психіатричними симптомами у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві.

Лікування, що передбачається цим винаходом, може бути тривалим, і пацієнт може отримувати лікування щонайменше протягом 2 тижнів, як, наприклад, щонайменше протягом 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

Антитіла за цим винаходом можуть, наприклад, бути моноклональними антитілами, що отримуються за допомогою гібридомного способу, вперше описаного в Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), або можуть бути моноклональними антитілами, що отримуються за допомогою рекомбінантних ДНК або інших способів, або переважніше можуть бути отримані за допомогою нового способу, розкритого в даному описі (фігура 9). Моноклональні антитіла також можна виділяти з фагових бібліотек антитіл за допомогою методик, описаних, наприклад, в Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991), і Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Моноклональні антитіла можна отримувати з будь-якого відповідного джерела. Таким чином, наприклад, моноклональні антитіла можна отримувати з гібридом, отриманих з мишачих В-лімфоцитів селезінки, отриманих від мишей, імунізованих антигеном, що представляє інтерес, наприклад, у вигляді клітин, що експресують антиген на поверхні, або нуклеїнової кислоти, що кодує антиген, що представляє інтерес. Моноклональні антитіла також можна отримувати з гібридом, що походять від клітин, що експресують антитіла, імунізованих людей або ссавців, відмінних від людини, таких як щури, кролі, собаки, вівці, кози, примати і т. п.

У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є гуманізованим антитілом. Гуманізовані моноклональні антитіла, направлені проти тау-білка, можна отримувати з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей, що несуть частини людської імунної системи, а не мишачої системи. Такі трансгенні і трансхромосомні миші включають мишей, які називаються в даному описі відповідно мишами HuMAb (від слів "гуманізоване моноклональне антитіло") і мишами KM, і в сукупності називаються в даному описі "трансгенними мишами".

Миша HuMAb містить мінілокус гена людського імуноглобуліну, який кодує нерearанжировані послідовності варіабельних і константних доменів важких ланцюгів ( $\mu$  і  $\gamma$ ) і варіабельних і константних доменів легких ланцюгів ( $\kappa$ ) людського імуноглобуліну, разом з цільовими мутаціями, які інактивують ендегенні локуси, що коднують  $\mu$ - і  $\kappa$ -ланцюги (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Відповідно, у мишей виявляється зменшена експресія мишачого IgM або IgK, і у відповідь на імунізацію введені трансгени, що коднують людський важкий і легкий ланцюг, піддаються перемиканню класу і соматичній мутації з утворенням високоафінних людських моноклональних антитіл IgG  $\kappa$ -ізо типу (Lonberg, N. et al. (1994), вище, огляд яких приведений в Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) і Harding, F. and Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). Отримання мишей HuMAb детально описано в Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaillon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Див. також US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 і WO 01/09187.

Миші HCo7, HCo12, HCo17 і HCo20 мають порушення JKD в своїх ендегенних генах легких ланцюгів (каппа) (як описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993)), порушення CMD в своїх ендегенних генах важких ланцюгів (як описано в прикладі 1 WO 01/14424) і трансген KCo5, що кодує людський легкий каппа-ланцюг (як описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Крім того, миші HCo7 мають трансген HCo7, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в US 5770429), миші HCo12 мають трансген HCo12, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в прикладі 2 WO 01/14424), миші HCo17 мають трансген HCo17, що кодує людський важкий ланцюг (як описано в прикладі 2 WO 01/09187), а миші HCo20 мають трансген HCo20, що кодує людський важкий ланцюг. Отримані в результаті миші експресують трансгени, що

кодують важкі ланцюги і легкі каппа-ланцюги людських імуноглобулінів, в генетичному оточенні, гомозиготному по руйнуванню ендегенних локусів, що кодують мишачі важкі ланцюги і легкі каппа-ланцюги.

У мишей лінії КМ ендегенний ген мишачого легкого каппа-ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню згідно з описаним в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), і ендегенний ген мишачого важкого ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню згідно з описаним в прикладі 1 WO 01/09187. Дана лінія мишей несе трансген КС<sub>5</sub>, що кодує людський легкий каппа-ланцюг, який описаний в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Дана лінія мишей також несе трансхромосому, що кодує людський важкий ланцюг, що складається з hCF-фрагмента хромосоми 14 (SC20), описаного в WO 02/43478. Мишей НС<sub>12</sub>-Balb/c, НС<sub>17</sub>-Balb/c і НС<sub>20</sub>-Balb/c можна отримувати шляхом схрещування НС<sub>12</sub>, НС<sub>17</sub> і НС<sub>20</sub> з КС<sub>5</sub>[J/K](Balb) згідно з описаним в WO 09/097006.

Миші rTg4510 є відомою моделлю таупатії, що забезпечує часовий і просторовий контроль над експресією трансгену, що кодує мутантний тау-білок. У мишей лінії КМ ендегенний ген мишачого легкого каппа-ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню згідно з описаним в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), і ендегенний ген мишачого важкого ланцюга був підданий гомозиготному руйнуванню згідно з описаним в прикладі 1 WO 01/09187. Дана лінія мишей несе трансген КС<sub>5</sub>, що кодує людський легкий каппа-ланцюг, який описаний в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Дана лінія мишей також несе трансхромосому, що кодує людський важкий ланцюг, що складається з hCF-фрагмента хромосоми 14 (SC20), що відповідає за зв'язування з епітопом, як описано в WO 02/43478.

Спленоцити від цих трансгенних мишей можна використовувати для утворення гібридом, що секретують гуманізовані моноклональні антитіла, згідно з добре відомими методиками. Гуманізовані моноклональні або поліклональні антитіла за цим винаходом, або антитіла за цим винаходом, що походять від інших видів, також можна отримувати трансгенним шляхом за допомогою отримання іншого ссавця, відмінного від людини, або рослини, що є трансгенними стосовно послідовностей важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, що представляють інтерес, і отримання з них антитіла у добувній формі. Що стосується отримання антитіл у ссавців трансгенним шляхом, антитіла можна отримувати в молоці кіз, корів або інших ссавців і добувати з нього. Див., наприклад, US 5827690; US 5756687; US 5750172 і US 5741957.

Антитіло за цим винаходом може відноситися до будь-якого ізотипу. При виборі ізотипу в типовому випадку виходитимуть з бажаних ефекторних функцій, таких як індукція ADCC. Ізотипами, що наводяться як приклад, є IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Можна використовувати константні домени будь-якого з людських легких ланцюгів каппа- або лямбда-типу. За бажанням, клас антитіла до тау-білка за цим винаходом можна перемкнути за допомогою відомих способів. Наприклад, антитіло за цим винаходом, яке спочатку було IgM, можна піддати перемиканню класу на антитіло IgG за цим винаходом. Додатково, методики перемикання класу можна застосовувати для перетворення одного підкласу IgG на інший, наприклад, з IgG1 на IgG2. Таким чином, ефекторну функцію антитіл за цим винаходом можна змінити шляхом перемикання ізотипу, наприклад, на антитіло IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE або IgM для різних терапевтичних шляхів застосування. У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є антитілом IgG1, наприклад, IgG1 к-ізотипу. Вважають, що антитіло відноситься до конкретного ізотипу, якщо його амінокислотна послідовність найбільшою мірою гомологічна цьому ізотипу в порівнянні з іншими ізотипами.

У одному варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є повнорозмірним антитілом, переважно антитілом IgG, зокрема, антитілом IgG1 к-ізотипу. У іншому варіанті здійснення антитіло за цим винаходом є епітопзв'язувальним фрагментом антитіла або одноланцюговим антитілом.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти можна, наприклад, отримувати шляхом розділення на епітопзв'язувальні фрагменти за допомогою традиційних методик, а епітопзв'язувальні фрагменти піддавати скринінгу стосовно корисності таким же чином, як описано в даному описі для повних антитіл. Наприклад, епітопзв'язувальні F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти можна отримувати шляхом обробки антитіла пепсином. Отриманий в результаті епітопзв'язувальний F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент можна обробити для відновлення дисульфідних містків з отриманням епітопзв'язувальних Fab'-фрагментів. Епітопзв'язувальні Fab'-фрагменти можна отримувати шляхом обробки антитіла IgG папаїном; епітопзв'язувальні Fab'-фрагменти можна отримувати шляхом розщеплювання антитіла IgG пепсином. Епітопзв'язувальний F(ab')-фрагмент також можна отримати за допомогою зв'язування Fab', описаних нижче, за допомогою тіоетерного зв'язку або дисульфідного зв'язку. Епітопзв'язувальний Fab'-фрагмент являє собою епітопзв'язувальний фрагмент антитіла, отриманий шляхом розрізання дисульфідного зв'язку в

шарнірному домені F(ab')<sub>2</sub>. Епітопзв'язувальний Fab'-фрагмент можна отримати шляхом обробки епітопзв'язувального F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента відновником, таким як дитіотреїтол. Епітопзв'язувальний фрагмент антитіла також можна отримати шляхом експресії нуклеїнових кислот, що кодують такі епітопзв'язувальні фрагменти, в рекомбінантних клітинах (див.,  
 5 наприклад, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Наприклад, химерний ген, що кодує частину епітопзв'язувального F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, може містити послідовності ДНК, що кодують СН1-домен і шарнірний домен Н-ланцюга, за якими розташований стоп-кодон для зупинки трансляції, для отримання такої усіченої молекули епітопзв'язувального фрагмента антитіла.

10 У одному варіанті здійснення антитіло до тау-білка являє собою одновалентне антитіло, переважно одновалентне антитіло, описане в WO 2007059782 (включена шляхом посилання в даний опис у її повному обсязі), що має делецію в шарнірній ділянці. Відповідно, в одному варіанті здійснення антитіло являє собою одновалентне антитіло, де вказане антитіло до тау-білка сконструйоване за допомогою способу, що включає: i) забезпечення конструктором нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг вказаного одновалентного антитіла, при цьому  
 15 вказаний конструктор містить нуклеотидну послідовність, що кодує VL-ділянку вибраного антиген-специфічного антитіла до тау-білка, і нуклеотидну послідовність, що кодує константну CL-ділянку Ig, де вказана нуклеотидна послідовність, що кодує VL-ділянку вибраного антиген-специфічного антитіла, і вказана нуклеотидна послідовність, що кодує CL-ділянку Ig, функціонально зв'язані разом, і де у випадку з підтипом IgG1 нуклеотидна послідовність, що кодує CL-ділянку, була модифікована так, щоб CL-ділянка не містила будь-яких амінокислот, здатних утворювати дисульфідні зв'язки або ковалентні зв'язки з іншими пептидами, що містять ідентичну амінокислотну послідовність CL-ділянки, у присутності поліклонального людського IgG або при введенні тварині або людині; ii) забезпечення конструктором нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг вказаного одновалентного антитіла, при цьому вказаний конструктор містить нуклеотидну послідовність, що кодує VH-ділянку вибраного антиген-специфічного антитіла, і нуклеотидну послідовність, що кодує константну СН-ділянку людського Ig, де нуклеотидна послідовність, що кодує СН-ділянку, була модифікована так, щоб ділянка, відповідна шарнірній ділянці і, як того вимагає підтип Ig, іншим ділянкам СН-ділянки, таким як СН3-ділянка, не містила будь-яких амінокислотних залишків, що беруть участь в утворенні дисульфідних зв'язків або ковалентних або стабільних нековалентних зв'язків між важкими ланцюгами з іншими пептидами, що містять ідентичну амінокислотну послідовність СН-ділянки людського Ig, у присутності поліклонального людського IgG або при введенні тварині, людині, де вказана нуклеотидна послідовність, що кодує VH-ділянку вибраного антиген-специфічного антитіла, і  
 35 вказана нуклеотидна послідовність, що кодує СН-ділянку вказаного Ig, функціонально зв'язані разом; iii) забезпечення клітинної системи експресії для отримання вказаного одновалентного антитіла; iv) отримання вказаного одновалентного антитіла шляхом сумісної експресії конструкторів нуклеїнових кислот з (i) і (ii) в клітинах клітинної системи експресії з (iii).

40 Так само, в одному варіанті здійснення антитіло до тау-білка за цим винаходом являє собою одновалентне антитіло, яке містить:

(i) варіабельний домен антитіла за цим винаходом, описаний в даному описі, або епітопзв'язувальну частину вказаного домену, і

(ii) СН-домен імуноглобуліну або його домен, що містить СН2- і СН3-домени, де СН-домен або його домен був модифікований таким чином, щоб домен, відповідний шарнірному домену і, якщо імуноглобулін не відноситься до підтипу IgG4, іншим доменам СН-домену, таким як СН3-домен, не містив будь-яких амінокислотних залишків, здатних утворювати дисульфідні зв'язки з ідентичним СН-доменом або інші ковалентні або стабільні нековалентні зв'язки між важкими ланцюгами з ідентичним СН-доменом у присутності поліклонального людського IgG.

50 У додатковому варіанті здійснення важкий ланцюг одновалентного антитіла за цим винаходом був модифікований так, щоб вся шарнірна ділянка була піддана делеції.

У іншому додатковому варіанті здійснення послідовність одновалентного антитіла була модифікована так, щоб вона не містила будь-яких акцепторних сайтів N-зв'язаного глікозилування.

Цей винахід також включає "біспецифічні антитіла", де ділянка зв'язування антитіла з тау-білком (наприклад, ділянка зв'язування з тау-білком моноклонального антитіла до тау-білка) є частиною двовалентного або полівалентного біспецифічного остову, який націлюється більш ніж на один епітоп (наприклад, другий епітоп може включати епітоп рецептора, що бере участь в активному транспорті, так що біспецифічне антитіло проявлятиме покращений транцитоз через біологічний бар'єр, такий як гематоенцефалічний бар'єр). Таким чином, в іншому  
 60 додатковому варіанті здійснення одновалентний Fab антитіла до тау-білка може бути з'єднаний

з додатковим Fab або scFv, які націлюються на інший білок, з отриманням біспецифічного антитіла. Біспецифічне антитіло може мати подвійну функцію, наприклад, терапевтичну функцію, що надається доменом антитіла, що зв'язується з тау-білком, і транспортну функцію, завдяки якій воно може зв'язуватися з молекулою рецептора для посилення перенесення через біологічний бар'єр, такий як гематоенцефалічний бар'єр.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом також включають одноланцюгові антитіла. Одноланцюгові антитіла представляють собою пептиди, в яких Fv-домени важкого і легкого ланцюгів з'єднані один з одним. У одному варіанті здійснення цей винахід передбачає одноланцюговий Fv (scFv), де важкий і легкий ланцюги в Fv антитіла до тау-білка за цим винаходом з'єднані за допомогою гнучкого пептидного лінкера (у типовому випадку завдовжки приблизно 10, 12, 15 або більше амінокислотних залишків) в один пептидний ланцюг. Способи отримання таких антитіл описані, наприклад, в US 4946778, Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) і McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). Одноланцюгове антитіло може бути одновалентним, якщо використовується тільки один VH і VL, двовалентним, якщо використовуються два VH і VL, або полівалентним, якщо використовується більше двох VH і VL.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти, описані в даному описі, можна модифікувати шляхом включення, можна модифікувати шляхом включення будь-якої придатної кількості модифікованих амінокислот і/або зв'язків з такими кон'югованими замісниками. Придатність в даному контексті зазвичай визначається здатністю щонайменше в значній мірі зберігати селективність стосовно тау-білка і/або специфічність стосовно тау-білка, притаманну недериватизованому початковому антитілу до тау-білка. Включення однієї або декількох модифікованих амінокислот може бути переважним, наприклад, для збільшення періоду напівжиття поліпептиду в сироватці крові, зменшення антигенності поліпептиду або збільшення стабільності поліпептиду при зберіганні. Амінокислоту(и) модифікують, наприклад, котрансляційно або посттрансляційно в ході отримання рекомбінантним шляхом (наприклад, шляхом N-зв'язаного глікозилювання в мотивах N-X-S/T в ході експресії в клітинах ссавців) або модифікують за допомогою синтетичних засобів. Необмежувальні приклади модифікованої амінокислоти включають глікозиловану амінокислоту, сульфатовану амінокислоту, преніловану (наприклад, фарнезиловану, геранілгераніловану) амінокислоту, ацетиловану амінокислоту, ациловану амінокислоту, ПЕГіловану амінокислоту, біотиніловану амінокислоту, карбоксиловану амінокислоту, фосфориловану амінокислоту і т. п. У літературі представлено безліч джерел, які можуть бути керівництвом для фахівця з модифікації амінокислот. Протоколи, що наводяться як приклад, знаходяться в Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. Модифіковану амінокислоту можна вибрати, наприклад, з глікозилованої амінокислоти, ПЕГілованої амінокислоти, фарнезилованої амінокислоти, ацетилованої амінокислоти, біотинілованої амінокислоти, амінокислоти, кон'югованої з ліпідним фрагментом, або амінокислоти, кон'югованої з органічним дериватизуючим засобом.

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом також можна модифікувати хімічним шляхом за допомогою ковалентного кон'югування з полімером, наприклад, для збільшення періоду напівжиття в кровотоці. Полімери, що наводяться як приклад, і способи приєднання їх до пептидів проілюстровані, наприклад, в US 4766106; US 4179337; US 4495285 і US 4609546. Додаткові ілюстративні полімери включають поліоксіетиловані поліолі і поліетиленгліколь (PEG) (наприклад, PEG з молекулярною масою від приблизно 1000 до приблизно 40000, наприклад, від приблизно 2000 до приблизно 20000, наприклад, приблизно 3000-12000 г/моль).

Антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна додатково застосовувати в способі діагностики або як діагностичний візуалізуючий ліганд.

У одному варіанті здійснення передбачені антитіла і їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом, що містять одну або декілька мічених радіоактивними ізотопами амінокислот. Мічене радіоактивним ізотопом антитіло до тау-білка можна застосовувати як в діагностичних, так і в терапевтичних цілях (ще однією можливою ознакою є кон'югування з міченими радіоактивним ізотопом молекулами). Необмежувальні приклади таких міток включають, без обмеження, вісмут ( $^{213}\text{Bi}$ ), вуглець ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ), хром ( $^{51}\text{Cr}$ ), кобальт ( $^{57}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ), мідь ( $^{64}\text{Cu}$ ), диспрозій ( $^{165}\text{Dy}$ ), ербій ( $^{169}\text{Er}$ ), фтор ( $^{18}\text{F}$ ), гадоліній ( $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ), галій ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), германій ( $^{68}\text{Ge}$ ), золото ( $^{198}\text{Au}$ ), гольмій ( $^{166}\text{Ho}$ ), водень ( $^3\text{H}$ ), індій ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{115}\text{In}$ ), йод ( $^{121}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), іридій ( $^{192}\text{Ir}$ ), залізо ( $^{59}\text{Fe}$ ), криптон ( $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ), лантан ( $^{140}\text{La}$ ), лютецій ( $^{177}\text{Lu}$ ), марганець ( $^{54}\text{Mn}$ ), молібден ( $^{99}\text{Mo}$ ), азот ( $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), кисень ( $^{15}\text{O}$ ), паладій ( $^{103}\text{Pd}$ ), фосфор ( $^{32}\text{P}$ ), калій ( $^{42}\text{K}$ ), празеодим ( $^{142}\text{Pr}$ ), прометій ( $^{149}\text{Pm}$ ), реній ( $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ), родій ( $^{105}\text{Rh}$ ), рубідій ( $^{81}\text{Rb}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ), рутеній

(<sup>82</sup>Ru, <sup>97</sup>Ru), самарій (<sup>153</sup>Sm), скандій (<sup>47</sup>Sc), селен (<sup>75</sup>Se), натрій (<sup>24</sup>Na), стронцій (<sup>85</sup>Sr, <sup>89</sup>Sr, <sup>92</sup>Sr), сірку (<sup>35</sup>S), технецій (<sup>99</sup>Tc), талій (<sup>201</sup>Tl), олово (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), ксенон (<sup>133</sup>Xe), ітербій (<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>177</sup>Yb), ітрій (<sup>90</sup>Y), цинк (<sup>65</sup>Zn) і цирконій (<sup>89</sup>Zr). Цирконій (<sup>89</sup>Zr) представляє особливий інтерес.

Способи отримання амінокислот, мічених радіоактивними ізотопами, і відповідних похідних пептидів відомі з рівня техніки (див., наприклад, Junghans et al., у *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2-е видання, під редакцією Chafner and Longo, Lippincott Raven (1996)) і US 4681581; US 4735210; US 5101827; US 5102990 (US RE35500), US 5648471 і US 5697902. Наприклад, радіоактивний ізотоп можна кон'югувати за допомогою способу з використанням хлораміну Т (Lindegren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl) Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

Цей винахід також передбачає антитіла до тау-білка і їх епітопзв'язувальні фрагменти, мічені за допомогою детекторної флуоресцентної мітки (такої як хелат рідкоземельного елемента (наприклад, хелат європію)), мітки флуоресцеїнового типу (наприклад, флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, 5-карбоксифлуоресцеїн, 6-карбоксифлуоресцеїн, дихлортриазиніламінофлуоресцеїн), мітки родамінового типу (наприклад, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® або данзилхлорид), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), фікоеритрину; умбеліферону, лісаміну; ціаніну; фікоеритрину, техаського червоного, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) або його аналога, всі з яких підходять для оптичного виявлення. Можна використовувати хемілюмінесцентні мітки (наприклад, люмінол, люциферазу, люциферин і екворин). Таку діагностику і виявлення також можна виконувати шляхом приєднання діагностичної молекули за цим винаходом до придатних до виявлення речовин, включаючи, без обмеження, різні ферменти, при цьому ферменти включають, без обмеження, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу, або до комплексів з простетичними групами, такими як, без обмеження, стрептавідин/біотин і авідин/біотин.

Можна використовувати хемілюмінесцентні мітки (наприклад, люмінол, люциферазу, люциферин і екворин). Таку діагностику і виявлення також можна виконувати шляхом приєднання діагностичної молекули за цим винаходом до детекторних речовин, що включають, без обмеження, різні ферменти, при цьому ферменти включають, без обмеження, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу, або до комплексів з простетичними групами, такими як, без обмеження, стрептавідин/біотин і авідин/біотин. Також можна використовувати парамагнітні мітки, і їх переважно виявляють за допомогою позитронно-емісійної томографії (PET) або однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (SPECT). Такі парамагнітні мітки включають, без обмеження, сполуки, що містять парамагнітні іони алюмінію (Al), барію (Ba), кальцію (Ca), церію (Ce), диспрозій (Dy), ербію (Er), європію (Eu), гадолінію (Gd), гольмію (Ho), іридію (Ir), літію (Li), магнію (Mg), марганцю (Mn), молібдену (Mo), неодиму (Nd), осмію (Os), кисню (O), паладію (Pd), платини (Pt), родію (Rh), рутенію (Ru), самарію (Sm), натрію (Na), стронцію (Sr), тербію (Tb), тулію (Tm), олова (Sn), титану (Ti), вольфраму (W) і цирконію (Zr), і, зокрема, Co<sup>+2</sup>, Cr<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Ga<sup>+3</sup>, Mn<sup>+3</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Ti<sup>+3</sup>, V<sup>+3</sup> і V<sup>+4</sup>, позитрон-випромінювальні ізотопи металів при використанні різних видів позитронно-емісійної томографії і нерадіоактивні парамагнітні іони металів.

Таким чином, в одному варіанті здійснення антитіла до тау-білка або його фрагмент, що зв'язується з тау-білком, за цим винаходом можуть бути міченими флуоресцентною міткою, хемілюмінесцентною міткою, парамагнітною міткою, радіоізотопною міткою або ферментною міткою. Мічене антитіло або його фрагмент можна застосовувати для виявлення наявності або вимірювання кількості вказаного тау-білка в головному мозку суб'єкта. Цей спосіб може включати виявлення або вимірювання кількості антитіла до тау-білка або фрагмента, що зв'язується з тау-білком, зв'язаного з вказаним тау-білком, шляхом візуалізації *in vivo* і може включати візуалізацію *ex vivo* вказаного антитіла до тау-білка або фрагмента, що зв'язується з тау-білком, зв'язаного з таким тау-білком.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до вектора експресії, що кодує один або декілька поліпептидних ланцюгів антитіла за цим винаходом або його фрагмента, що зв'язується з тау-білком. Такі вектори експресії можна застосовувати для отримання антитіл або їх епітопзв'язувальних фрагментів за цим винаходом рекомбінантним шляхом.

Вектор експресії в контексті цього винаходу може являти собою будь-який відповідний ДНК- або РНК-вектор, включаючи хромосомні, нехромосомні і синтетичні вектори на основі нуклеїнових кислот (послідовність нуклеїнової кислоти, що містить відповідний набір елементів

контролю експресії). Приклади таких векторів включають похідні SV40, бактеріальні плазмиди, фагову ДНК, бакуловірус, дріжджові плазмиди, вектори, отримані в результаті об'єднання плазмід і фагової ДНК, і вектори на основі вірусної нуклеїнової кислоти (РНК або ДНК). У одному варіанті здійснення нуклеїнова кислота, що кодує антитіло до тау-білка, міститься у векторі на основі "голої" ДНК або РНК, включаючи, наприклад, лінійний експресійний елемент (описаний, наприклад, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), векторі на основі щільно укладеної нуклеїнової кислоти (як описано, наприклад, в US 6077835 і/або WO 00/70087), плазмідному векторі, такому як pBR322, pUC 19/18 або pUC 118/119, векторі мінімального розміру "midge" на основі нуклеїнової кислоти (як описано, наприклад, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)) або представлена у вигляді векторного конструкта нуклеїнової кислоти, що осаджується, такого як конструкт, що осаджується  $\text{CaPO}_4$  (як описано, наприклад, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), і Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Такі вектори на основі нуклеїнових кислот і їх застосування добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, US 5589466 і US 5973972).

У одному варіанті здійснення вектор підходить для експресії антитіл до тау-білка або їх епітопзв'язувальних фрагментів за цим винаходом в бактеріальній клітині. Приклади таких векторів включають вектори експресії, такі як BlueScript (Stratagene), вектори pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509 (1989), вектори pET (Novagen, Мадісон, Вісконсін) і т. п.

Вектор експресії може також, або альтернативно, бути вектором, відповідним для експресії в дріжджовій системі. Можна використовувати будь-який вектор, відповідний для експресії в дріжджовій системі. Відповідні вектори включають, наприклад, вектори, що містять конститутивні або індуковані промотори, такі як промотори генів фактора альфа, алкогольоксидази і PGH (огляд яких наведений в: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. et al. *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. et al. *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Boer, E. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), і Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

У векторі експресії за цим винаходом нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло до тау-білка, можуть містити будь-який відповідний промотор, енхансер і інші елементи, сприяючі експресії, або бути пов'язаними з ними. Приклади таких елементів включають сильні промотори експресії (наприклад, IE промотор/енхансер CMV людини, а також промотори RSV, SV40, SL3-3, MMTV і LTR HIV), ефективні полі-(A)-послідовності термінації, точку початку реплікації для продукту плазмиди в *E. coli*, ген стійкості до антибіотиків як селективний маркер і/або відповідний сайт клонування (наприклад, полілінкер). Нуклеїнові кислоти також можуть містити індукований промотор, а не конститутивний промотор, такий як IE CMV (фахівець в даній галузі техніки зрозуміє, що такі терміни фактично описують ступінь експресії гена в певних умовах).

У ще одному додатковому аспекті цей винахід відноситься до рекомбінантної еукаріотичної або прокаріотичної клітини-хазяїна, такої як трансфектома, яка виробляє антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за цим винаходом, визначені в даному описі, або біспецифічну молекулу за цим винаходом, визначену в даному описі. Приклади клітин-хазяїнів включають клітини дріжджів, бактерій і ссавців, такі як клітини CHO або HEK. Наприклад, в одному варіанті здійснення цей винахід передбачає клітину, що містить нуклеїнову кислоту, стабільно інтегровану в клітинний геном, яка містить послідовність, що кодує продукт експресії у вигляді антитіла до тау-білка за цим винаходом або його епітопзв'язувального фрагмента. У іншому варіанті здійснення цей винахід передбачає клітину, що містить неінтегровану нуклеїнову кислоту, таку як плазміда, косміда, фагміда або лінійний експресійний елемент, яка містить послідовність, що кодує продукт експресії у вигляді антитіла до тау-білка або його епітопзв'язувального фрагмента за цим винаходом.

У додатковому аспекті цей винахід відноситься до способу отримання антитіла до тау-білка за цим винаходом, при цьому вказаний спосіб включає стадії: а) культивування гібридами або клітини-хазяїна за цим винаходом, як описано в даному описі вище, і b) очищення антитіла за цим винаходом від культурального середовища.

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до препарату в тому сенсі, в якому цей термін використовується в даному описі, який містить антитіло до тау-білка, визначене в даному описі, і який практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах, які або не здатні зв'язуватися з тау-білком, або істотним чином не змінюють функціональні характеристики препарату, спрямовані проти тау-білка. Таким чином, такий препарат не охоплює сироватку крові, що утворюється в природних умовах, або очищений похідний продукт

такої сироватки крові, який містить суміш антитіла до тау-білка і іншого антитіла, яке не змінює функціональні характеристики антитіла до тау-білка в препараті, де такі функціональні характеристики являють собою:

- (i) практично відсутню здатність до зв'язування з нефосфорилованим тау-білком;
- 5 (ii) практично відсутню здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S404 і не фосфорилованим в S396;
- (iii) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S396;
- (iv) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим як в S396, так і в S404;
- (v) здатність селективно розрізняти фосфориловані залишки S396 і S404 тау-білка, так що
- 10 вони практично не здатні зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404;
- (vi) здатність до зв'язування з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера;
- (vii) здатність розрізняти патологічний і непатологічний людські тау-білки і/або
- (viii) здатність до специфічного зменшення смуг гіперфосфорилизованого тау-білка розміром
- 15 64 кДа і 70 кДа щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуги тау-білка розміром 55 кДа більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей rTg4510 або здатність до специфічного зменшення смуг фосфорилизованого в S396 гіперфосфорилизованого тау-білка щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуг негіперфосфорилизованого тау-білка більше, ніж на 10 %, при
- 20 застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами з головного мозку людей з AD.

Цей винахід, зокрема, відноситься до препаратів такого антитіла до тау-білка, що має структурну зміну в своїй амінокислотній послідовності (у будь-яких своїх CDR, варіабельних доменах, залишках каркасної ділянки і/або константних доменах) в порівнянні із структурою

25 антитіла до тау-білка, що зустрічається в природі, де вказана структурна зміна обумовлює прояв антитілом до тау-білка значно змінених функціональних характеристик (тобто більш ніж з 20 % різницею, більш ніж з 40 % різницею, більш ніж з 60 % різницею, більш ніж з 80 % різницею, більш ніж з 100 % різницею, більш ніж з 150 % різницею, більш ніж з 2-кратною різницею, більш ніж з 4-кратною різницею, більш ніж з 5-кратною різницею або більш ніж з 10-

30 кратною різницею у функціональних характеристиках) в порівнянні з функціональними характеристиками, що проявляються вказаним антитілом до тау-білка, що зустрічається в природі; де вказані функціональні характеристики являють собою:

- (i) практично відсутню здатність до зв'язування з нефосфорилованим тау-білком;
- (ii) практично відсутню здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S404 і не
- 35 фосфорилованим в S396;
- (iii) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S396;
- (iv) здатність до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим як в S396, так і в S404;
- (v) здатність селективно розрізняти фосфориловані залишки S396 і S404 тау-білка, так що вони практично не здатні зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404;
- 40 (vi) здатність до зв'язування з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера;
- (vii) здатність розрізняти патологічний і непатологічний людські тау-білки і/або
- (viii) здатність до специфічного зменшення смуг гіперфосфорилизованого тау-білка розміром
- 45 64 кДа і 70 кДа щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуги тау-білка розміром 55 кДа більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей rTg4510 або здатність до специфічного зменшення смуг фосфорилизованого в S396 гіперфосфорилизованого тау-білка щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуг негіперфосфорилизованого тау-білка більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами головного мозку
- 50 людей з AD.

Термін "практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах" відноситься до повної відсутності таких антитіл, що утворюються в природних умовах, в таких препаратах або до включення таких антитіл, що утворюються в природних умовах, в такі препарати в концентрації, в якій вони істотним чином не впливають на властивості зв'язування з тау-білком

55 даних препаратів. Говорять, що антитіло є "виділеним", якщо воно не має еквівалента, що утворюється в природних умовах, або було відокремлене або очищене від компонентів, які в природних умовах супроводжують його.

Термін "антитіла, що утворюються в природних умовах", використовуваний стосовно таких препаратів, відноситься до антитіл (включаючи аутоантитіла, що утворюються в природних умовах), утворення яких відбувається в організмі живих людей або інших тварин як природний



наслідок функціонування їх імунних систем.

Таким чином, препарати за цим винаходом не виключають, а насправді явним чином охоплюють препарати, які містять антитіло до тау-білка і спеціально додане додаткове антитіло, здатне зв'язуватися з епітопом, який не міститься в тау-білку. Такі препарати, зокрема, включають їх варіанти здійснення, в яких препарат проявляє підвищену ефективність в лікуванні хвороби Альцгеймера (AD), хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP) і кортикобазальної дегенерації (CBD). Додатково, цей винахід направлений на препарати, які містять антитіло, антитіла до тау-білка або їх епітопзв'язувальні фрагменти, призначені для застосування в лікуванні психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, і психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві. Додатково, препарати за цим винаходом містять антитіло, антитіла до тау-білка або їх епітопзв'язувальні фрагменти, які можна застосовувати в лікуванні інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона.

У ще одному додатковому аспекті цей винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить:

(i) антитіло до тау-білка або його епітопзв'язувальний фрагмент, обидва з яких визначені в даному описі, або препарат в тому сенсі, в якому цей термін визначений в даному описі, який містить таке антитіло до тау-білка або його епітопзв'язувальний фрагмент; і

(ii) фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтичні композиції можна складати з фармацевтично прийнятними носіями або розріджувачами, а також з будь-якими іншими відомими допоміжними засобами і наповнювачами згідно з традиційними методиками, такими як розкриті в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

Фармацевтично прийнятні носії або розріджувачі, а також будь-які інші відомі допоміжні засоби і наповнювачі мають бути придатними для вибраної сполуки цього винаходу і вибраного способу введення. Придатність носіїв і інших компонентів фармацевтичних композицій визначають на підставі відсутності значного негативного впливу на бажані біологічні властивості вибраної сполуки або фармацевтичної композиції цього винаходу (наприклад, на підставі меншого, ніж істотний вплив (на підставі 10 % або меншого відносного інгібування, 5 % або меншого відносного інгібування і т. д.)) стосовно зв'язування з епітопом.

Фармацевтична композиція цього винаходу також може містити розріджувачі, наповнювачі, солі, буфери, детергенти (наприклад, неіонний детергент, такий як Tween-20 або Tween-80), стабілізатори (наприклад, цукри або вільні протеїногенні амінокислоти), консерванти, фіксатори тканин, солюбілізатори і/або інші матеріали, відповідні для включення у фармацевтичну композицію. Розріджувач вибирають так, щоб він не впливав на біологічну активність комбінації. Прикладами таких розріджувачів є дистильована вода, фізіологічний фосфатно-сольовий буферний розчин, розчини Рінгера, розчин декстрози і розчин Хенка. Крім того, фармацевтична композиція або склад також можуть містити інші носії або нетоксичні нетерапевтичні неімунногенні стабілізатори і т. п. Композиції також можуть містити великі макромолекули, що поволі метаболізуються, такі як білки, полісахариди, такі як хітозан, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти і сополімери (наприклад, функціоналізована латексом сефароза, агароза, целюлоза і т. п.), полімери амінокислот, сополімери амінокислот і агрегати ліпідів (наприклад, масляні краплі або ліпосоми).

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях цього винаходу можна змінювати для того, щоб отримати кількість активного інгредієнта, яка є ефективною для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретного пацієнта, композиції і способу введення. Вибраний рівень дози залежатиме від ряду фармакокінетичних чинників, зокрема активності конкретних використовуваних композицій цього винаходу або їх аміду, шляху введення, часу введення, швидкості виведення конкретної використовуваної сполуки, тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук і/або матеріалів, вживаних в комбінації з конкретними використовуваними композиціями, віку, статі, ваги, стану, загального стану здоров'я і анамнезу пацієнта, що піддається лікуванню, а також аналогічних чинників, добре відомих в галузі медицини.

Фармацевтичну композицію можна вводити будь-яким відповідним шляхом і способом, зокрема парентеральним, місцевим, пероральним або інтраназальним способом, для профілактичного і/або терапевтичного лікування. Згідно з одним варіантом здійснення фармацевтичну композицію цього винаходу вводять парентерально. Використовувані в даному описі винаходу фрази "парентеральне введення" і "що вводиться парентерально" означають способи введення, відмінні від ентерального і місцевого введення, зазвичай шляхом ін'єкції, і включають епідермальну, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну,

інтратекальну, внутрішньокапсулярну, внутрішньоочноямкову, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньочеревну, внутрішньосухожильну, транстрахеальну, підшкірну, субкутикулярну, внутрішньосуставну, підкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, внутрічерепну, інтраторакальну, епідуральну і внутрішньогрудинну ін'єкцію і інфузію.

5 Додаткові відповідні шляхи введення сполуки за цим винаходом *in vivo* і *in vitro* добре відомі з рівня техніки і можуть бути вибрані звичайними фахівцями в даній галузі техніки.

У одному варіанті здійснення цю фармацевтичну композицію вводять за допомогою внутрішньовенної або підшкірної ін'єкції або інфузії.

10 Фармацевтично прийнятні носії включають будь-які можливі відповідні розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, засоби, що надають ізотонічність, антиоксиданти і засоби, що уповільнюють абсорбцію, і т. п., які є фізіологічно сумісними із сполуками цього винаходу.

15 Приклади відповідних водних і неводних носіїв, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях цього винаходу, включають воду, сольовий розчин, фосфатно-сольовий буферний розчин, етанол, декстрозу, поліоли (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і т. п.), а також їх придатні суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, кукурудзяна олія, арахісова олія, бавовняна олія і кунжутна олія, колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози, трагакантову камедь і придатні для ін'єкцій органічні естери, такі як етилолеат, і/або різні буфери. В галузі фармацевтики добре відомі інші носії.

20 Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для індивідуального отримання стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких середовищ і засобів для фармацевтично активних речовин відоме з рівня техніки. За винятком випадків, коли будь-яке традиційне середовище або засіб є несумісними з активною сполукою, передбачається їх застосування у фармацевтичних композиціях цього винаходу.

Належну плінність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування матеріалів для покриття, таких як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсій і шляхом застосування поверхнево-активних речовин.

30 Фармацевтичні композиції цього винаходу також можуть містити фармацевтично прийнятні антиоксиданти, наприклад, (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, гідрохлорид цистеїну, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфит натрію і т. п.; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутилований гідроксіанізол (BHA), бутилований гідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол і т. п.; і (3) металохелатори, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота і т. п.

35 Фармацевтичні композиції за цим винаходом також можуть містити засоби, що забезпечують ізотонічність, такі як цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт, сорбіт, гліцерин, або хлорид натрію, в композиціях.

40 Фармацевтичні композиції за цим винаходом також можуть містити одну або декілька допоміжних речовин, відповідних для вибраного шляху введення, такі як консерванти, зволожувальні речовини, емульгатори, диспергуючі речовини, консерванти або буфери, які можуть збільшити термін зберігання або ефективність фармацевтичної композиції. Сполуки цього винаходу можна отримувати з носіями, які захищатимуть сполуки від швидкого вивільнення, наприклад, у вигляді складу з контрольованим вивільненням, в тому числі у вигляді імплантатів, трансдермальних пластрів і мікроінкапсульованих систем доставки. Такі носії можуть включати желатин, гліцерилмоностеарат, гліцерилдистеарат, полімери, які руйнуються біологічно, біосумісні полімери, такі як сополімер етилену і вінілацетату, поліангідриди, полігліколеву кислоту, колаген, поліортоестери і полімолочну кислоту, окремо або разом з воском, або інші матеріали, добре відомі з рівня техніки. Способи отримання таких складів в цілому відомі фахівцям в даній галузі техніки. Див., наприклад, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

50 У одному варіанті здійснення сполуки за цим винаходом можна складати для забезпечення належного розподілу *in vivo*. Фармацевтично прийнятні носії для парентерального введення включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для індивідуального приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких середовищ і засобів для фармацевтично активних речовин відоме з рівня техніки. За винятком випадків, коли які-небудь традиційне середовище або засіб є несумісними з активною сполукою, передбачається їх застосування у фармацевтичних композиціях за цим винаходом. Додаткові активні сполуки також можна включати до складу композицій.

60 Фармацевтичні композиції для ін'єкцій як правило мають бути стерильними і стабільними в

умовах виготовлення і зберігання. Композиція може бути складена у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, відповідної для високої концентрації лікарського засобу. Носій може бути водним або неводним розчинником або дисперсійним середовищем, що містить, наприклад, воду, етанол, поліолі (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і т. п.) і відповідні їх суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, і придатні для ін'єкцій органічні естери, такі як етилолеат. Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсії і шляхом застосування поверхнево-активних речовин. В багатьох випадках буде переважним включення засобів, що забезпечують ізотонічність, наприклад цукрів, багатоатомних спиртів, таких як гліцерин, маніт, сорбіт, або хлориду натрію в композицію. Тривалого всмоктування ін'єкційних композицій можна досягти шляхом включення в композицію засобу, що уповільнює всмоктування антитіла, наприклад моностеаратних солей і желатину. Стерильні ін'єкційні розчини можна отримати шляхом поміщення активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, наприклад, перелічених вище, при необхідності з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією. Зазвичай дисперсії отримують шляхом поміщення активної сполуки в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти, наприклад, з перелічених вище. У разі стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів прикладами способів отримання порошків є вакуумна сушка і сублімаційна сушка (ліофілізація), в результаті якої отримують порошкоподібний активний інгредієнт плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з їх розчину, заздалегідь підданого стерилізуючій фільтрації.

Стерильні ін'єкційні розчини можна отримати шляхом поміщення активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, при необхідності з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією. Зазвичай дисперсії отримують шляхом поміщення активної сполуки в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти з перелічених вище. У разі стерильних порошків для отримання стерильних ін'єкційних розчинів прикладами способів приготування є вакуумна сушка і сублімаційна сушка (ліофілізація), в результаті якої отримують порошкоподібний активний інгредієнт плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з їх розчину, заздалегідь підданого стерилізуючій фільтрації.

Схеми прийому у вищезгаданих способах лікування і шляхах застосування, описаних в даному описі винаходу, коректують для отримання оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної відповіді). Наприклад, можна вводити одноразову болюсну дозу, можна вводити декілька розділених доз протягом деякого часу, або дозу можна пропорційно зменшувати або збільшувати, як визначається потребами терапевтичної ситуації. Композиції для парентерального введення можна складати у вигляді одиначної лікарської форми для простоти введення і рівномірності дозування. Одиначна лікарська форма, використовувана в даному описі винаходу, відноситься до фізично дискретних одиниць, зручних в якості одиначних доз для суб'єктів, що підлягають лікуванню; при цьому кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активної сполуки, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту, спільно з необхідним фармацевтичним носієм. Технічні вимоги до одиначних лікарських форм цього винаходу продиктовані (а) унікальними характеристиками активної сполуки і конкретним терапевтичним ефектом, якого необхідно досягти, і (б) обмеженнями, притаманними галузі складання такої активної сполуки для лікування чутливості у індивідуумів, і безпосередньо залежать від них.

Ефективні дози і схеми прийому антитіл або їх епітопзв'язувальних фрагментів за цим винаходом залежать від захворювання або стану, що підлягають лікуванню, і можуть бути визначені фахівцями в даній галузі техніки. У будь-який заданий день, коли дають дозу, доза може знаходитися в діапазоні від приблизно 0,0001 до приблизно 100 мг/кг і частіше від приблизно 0,01 до приблизно 5 мг/кг ваги тіла реципієнта. Наприклад, дози можуть складати 1 мг/кг ваги тіла або 10 мг/кг ваги тіла або знаходитися в діапазоні 1-10 мг/кг ваги тіла. Таким чином, ілюстративні дози включають від приблизно 0,1 до приблизно 10 мг/кг ваги тіла, від приблизно 0,1 до приблизно 5 мг/кг ваги тіла, від приблизно 0,1 до приблизно 2 мг/кг ваги тіла, від приблизно 0,1 до приблизно 1 мг/кг ваги тіла, наприклад, приблизно 0,15 мг/кг ваги тіла, приблизно 0,2 мг/кг ваги тіла, приблизно 0,5 мг/кг ваги тіла, приблизно 1 мг/кг ваги тіла, приблизно 1,5 мг/кг ваги тіла, приблизно 2 мг/кг ваги тіла, приблизно 5 мг/кг ваги тіла або приблизно 10 мг/кг ваги тіла.

Лікар із стандартною кваліфікацією в даній галузі легко може визначити і призначити ефективну кількість необхідної фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар може почати з доз антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента за цим винаходом, використовуваних у

фармацевтичній композиції, нижчих рівнів, ніж потрібно для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, і поступово підвищувати дозу до досягнення бажаного ефекту. В цілому, відповідною добовою дозою композиції цього винаходу буде така кількість сполуки, яка є найнижчою дозою, ефективною для отримання терапевтичного ефекту. Така ефективна доза зазвичай залежатиме від описаних вище чинників. Введення може бути, наприклад, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревним або підшкірним. За бажанням, ефективну добову дозу фармацевтичної композиції можна вводити у вигляді двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше частин дози, що вводяться окремо з відповідними інтервалами протягом доби, необов'язково у вигляді одиничних лікарських форм. Хоча сполуки цього винаходу можна вводити окремо, переважно вводити сполуки у вигляді фармацевтичної композиції, описаної вище.

Мічені антитіла або їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна застосовувати в діагностичних цілях для виявлення, діагностики або моніторингу захворювань або порушень. Цей винахід передбачає виявлення або діагностику нейродегенеративного або когнітивного захворювання або порушення, зокрема, без обмеження, хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP) і кортикобазальної дегенерації (CBD), що включають: (а) проведення аналізу наявності піроглутамінованих Аβ-фрагментів у клітинах або зразках тканин суб'єкта за допомогою одного або декількох антитіл, що специфічно зв'язуються з тау-білком; і (b) проведення порівняння рівня антигену з контрольним рівнем, наприклад, з рівнями в зразках нормальних тканин, при якому підвищення аналізованого рівня антигену в порівнянні з контрольним рівнем антигену свідчить про захворювання або порушення або свідчить про тяжкість захворювання або порушення.

Антитіла або їх епітопзв'язувальні фрагменти за цим винаходом можна застосовувати для аналізу тау-білка або фрагментів тау-білка в біологічному зразку за допомогою імуногістохімічних способів, добре відомих з рівня техніки. Інші способи з використанням антитіл, застосовні для виявлення білка, включають імунологічні аналізи, такі як імуоферментний аналіз (ELISA) і радіоімунологічний аналіз (RIA), а також аналізи з використанням платформи Meso Scale Discovery (MSD). У таких наборах і способах можна застосовувати відповідні мітки для антитіл, і мітки, відомі з рівня техніки, включають ферментні мітки, такі як лужна фосфатаза і глюкозооксидаза; радіоізотопні мітки, такі як йод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), вуглець ( $^{14}\text{C}$ ), сірка ( $^{35}\text{S}$ ), тритій ( $^3\text{H}$ ), індій ( $^{121}\text{In}$ ) і технецій ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ); а також люмінесцентні мітки, такі як люмінол і люцифераза; і флуоресцентні мітки, такі як флуоресцеїн і родамін.

Наявність мічених антитіл до тау-білка або їх фрагментів, що зв'язуються з тау-білком, можна виявляти *in vivo* в діагностичних цілях. У одному варіанті здійснення діагностики включає: а) введення суб'єктові ефективної кількості такої міченої молекули; б) очікування протягом деякого проміжку часу після введення для забезпечення концентрації міченої молекули в місцях відкладення Аβ (за наявності таких) і для забезпечення очищення від незв'язаної міченої молекули до фоновому рівню; с) визначення фоновому рівня і d) виявлення міченої молекули у суб'єкта таким чином, що виявлення міченої молекули на рівні, що перевищує фоновий, свідчить про те, що суб'єкт має захворювання або порушення, або свідчить про тяжкість захворювання або порушення. Відповідно до такого варіанта здійснення молекулу мітять візуалізуючим компонентом, відповідним для виявлення, за допомогою конкретної системи візуалізації, відомої фахівцям в даній галузі. Фонові рівні можна визначити за допомогою різних способів, відомих з рівня техніки, зокрема шляхом порівняння кількості виявленого міченого антитіла із стандартним значенням, заздалегідь визначеним для конкретної системи візуалізації. Способи і системи, які можна застосовувати в способах діагностики за цим винаходом, включають, без обмеження, комп'ютерну томографію (СТ), сканування всього тіла, таке як позитронно-емісійна томографія (PET), магнітно-резонансна візуалізація (MRI) і ультразвукове дослідження.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в даному описі, для застосування в терапії.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в даному описі, для застосування в лікуванні, діагностиці або візуалізації таупатій.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в даному описі, для застосування в лікуванні хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP) і кортикобазальної дегенерації (CBD).

У додатковому аспекті цей винахід передбачає моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в даному описі, для застосування у виробництві

лікарського препарату для лікування, діагностики або візуалізації таупатій.

Лікарський препарат переважно призначений для лікування хвороби Альцгеймера (AD), хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP) і кортикобазальної дегенерації (CBD), найпреважніше хвороби Альцгеймера (AD). Лікарський препарат також переважно призначений для лікування психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, і психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тільцями Леві.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає спосіб лікування, діагностики або візуалізації хвороби Альцгеймера або інших таупатій у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає введення лікарського препарату на основі моноклонального антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента, визначених в даному описі, вказаному суб'єктові в ефективній кількості.

У переважному варіанті здійснення лікування є тривалим і переважно продовжується щонайменше протягом 2 тижнів, як, наприклад, щонайменше протягом 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

У додатковому аспекті цей винахід передбачає набір, що містить антитіло або його фрагмент, визначені в даному описі, для застосування в терапії.

Варіанти здійснення

1. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка, таким як фосфорилований залишок 396 SEQ ID NO: 33.

2. Антитіло відповідно до варіанта здійснення 1, що складається з інтактного антитіла.

3. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіантів здійснення 1 або 2, що містять епітопзв'язувальний фрагмент, вибраний з групи, що складається з Fv-фрагмента (наприклад, одноланцюгового Fv і Fv, стабілізованого дисульфідними зв'язками); Fab-подібного фрагмента (наприклад, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента і F(ab)2-фрагмента); (Fv)2-CH3-домену мініантитіла і доменного антитіла (наприклад, окремого варіабельного VH-домену або варіабельного VL-домену), або що складаються з нього.

4. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло вибране з групи, що складається з антитіл підтипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

5. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, які є людськими або гуманізованими.

6. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло або епітопзв'язувальний фрагмент проявляють одне або декілька з наступних властивостей:

(a) селективність і специфічність стосовно людського патологічного тау-білка;

(b) афінність зв'язування (KD) з pTau 386-408 (pS396/pS404) (SEQ ID NO: 33), що становить 0,5-10 nM, як, наприклад, 1-5 nM або 1-2 nM.

7. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де вказане антитіло практично не зв'язується з фосфорилованим залишком 404 тау-білка (SEQ ID NO: 33).

8. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що містять:

(a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 1 або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах;

(b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 2 або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах;

(c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 3 або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах;

(d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 4 або амінокислотну послідовність, що має не більше 4 відмінностей в амінокислотах, або не більше 3 відмінностей в амінокислотах, або не більше 2 відмінностей в амінокислотах, або не більше 1 відмінності в амінокислотах;

(e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 5 або





де компонент для збільшення періоду напівжиття *in vivo* вибраний з групи, що складається з поліетиленгліколю (PEG), людського сироваткового альбуміну, глікозилуючих груп, жирних кислот і декстрану.

20. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх варіантів здійснення, де антитіло додатково містить детектовний компонент.

21. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 20, де детектовний компонент вибраний з групи, що складається з флуоресцентної мітки, хемілюмінесцентної мітки, парамагнітної мітки, радіоізотопної мітки або ферментної мітки.

22. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіантів здійснення 20 або 21, де детектовний компонент містить радіоактивний ізотоп або складається з нього.

23. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 22, де радіоактивний ізотоп вибраний з групи, що складається з  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{123}\text{I}$  і  $^{201}\text{Tl}$ .

24. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 21, де детектовний компонент містить парамагнітний ізотоп або складається з нього.

25. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 24, де парамагнітний ізотоп вибраний з групи, що складається з  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Cr}$  і  $^{56}\text{Fe}$ .

26. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 20-25, де детектовний компонент виявляється за допомогою методики візуалізації, такої як SPECT, PET, MRI, оптична або ультразвукова візуалізація.

27. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 20-26, де детектовний компонент опосередковано з'єднаний з антитілом або його епітопзв'язувальним фрагментом за допомогою лінкерного компоненту.

28. Антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 27, де лінкерний компонент вибраний з групи, що складається з похідних 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраоцтової кислоти (DOTA), дефероксаміну (DFO), похідних діетилентриамінпентаоцтової кислоти (DTPA), похідних S-2-(4-ізотіоціанатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триоцтової кислоти (NOTA) і похідних 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетраоцтової кислоти (TETA).

29. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, де важкий ланцюг вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 35, а легкий ланцюг вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 36.

30. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що містять:

(a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 28;

(b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21 і SEQ ID NO: 29; і

(c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22 і SEQ ID NO: 30; і

(d) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19 і SEQ ID NO: 27.

31. Антитіло за цим винаходом або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1-7, що містять:

(a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20;

(b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21;

(c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22; і

(d) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19.

32. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-31.

33. Молекула нуклеїнової кислоти відповідно до варіанта здійснення 32, де молекула є молекулою кДНК.

34. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, визначену у варіантах здійснення 32 або 33.

35. Рекombінантна клітина-хазяїн, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, визначену в будь-якому з варіантів здійснення 32-34.

36. Спосіб отримання антитіла або епітопзв'язувального фрагмента, визначених в будь-якому з варіантів здійснення 1-31, при цьому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, визначеної у варіанті здійснення 35, в умовах, що забезпечують можливість експресії кодованого антитіла або його епітопзв'язувального фрагмента.



37. Препарат, що містить антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх пунктів, де вказаний препарат практично не містить антитіл, що утворюються в природних умовах, які або не здатні зв'язуватися з тау-білком, або істотним чином не змінюють функціональні характеристики препарату, спрямовані проти тау-білка, де

- 5 вказані функціональні характеристики вибрані з групи, що складається з:
  - (i) практично відсутньої здатності до зв'язування з нефосфорилованим тау-білком;
  - (ii) практично відсутньої здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S404 і не фосфорилованим в S396;
  - (iii) здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S396;
  - 10 (iv) здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим як в S396, так і в S404;
  - (v) здатності селективно розрізняти фосфориловані залишки S396 і S404 тау-білка, так що вони практично не здатні зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404;
  - (vi) здатності до зв'язування з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера;
  - 15 (vii) здатності розрізняти патологічний і непатологічний людські тау-білки і/або
  - (viii) здатності до специфічного зменшення смуг гіперфосфорилизованого тау-білка розміром 64 кДа і 70 кДа щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуги тау-білка розміром 55 кДа більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей гTg4510 або здатності до специфічного зменшення смуг
  - 20 фосфорилизованого в S396 гіперфосфорилизованого тау-білка щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуг негіперфосфорилизованого тау-білка більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами з головного мозку людей з AD.

38. Препарат, що містить антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент відповідно до будь-якого з попередніх пунктів, де вказане антитіло або його вказаний епітопзв'язувальний фрагмент мають структурну зміну в своїй амінокислотній послідовності в порівнянні із структурою антитіла, що зустрічається в природі, до тау-білка, де вказана структурна зміна обумовлює прояв вказаним антитілом або вказаним фрагментом змінених функціональних характеристик в порівнянні з функціональними характеристиками, що проявляються вказаним антитілом до тау-білка, що зустрічається в природі, де вказані функціональні характеристики вибрані з групи, що складається з:

- (i) практично відсутньої здатності до зв'язування з нефосфорилованим тау-білком;
  - (ii) практично відсутньої здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S404 і не фосфорилованим в S396;
  - 35 (iii) здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим в S396;
  - (iv) здатності до зв'язування з тау-білком, фосфорилованим як в S396, так і в S404;
  - (v) здатності селективно розрізняти фосфориловані залишки S396 і S404 тау-білка, так що вони практично не здатні зв'язуватися з фосфорилованим залишком 404;
  - (vi) здатності до зв'язування з гіперфосфорилованим тау-білком з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера;
  - 40 (vii) здатності розрізняти патологічний і непатологічний людські тау-білки і/або
  - (viii) здатності до специфічного зменшення смуг гіперфосфорилизованого тау-білка розміром 64 кДа і 70 кДа щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуги тау-білка розміром 55 кДа більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з імуновиснаженими екстрактами від трансгенних мишей гTg4510 або здатності до специфічного зменшення смуг
  - 45 фосфорилизованого в S396 гіперфосфорилизованого тау-білка щонайменше на 90 % без зменшення при цьому смуг негіперфосфорилизованого тау-білка більше, ніж на 10 %, при застосуванні, згідно з описаним в даному описі, з посмертними екстрактами з головного мозку людей з AD.

39. Фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-31, або препарат, визначений в будь-якому з варіантів здійснення 37-38; і фармацевтично прийнятний носій.

40. Моноклональне антитіло або його фрагмент згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарат згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтична композиція згідно з варіантом здійснення 39 для застосування в медицині.

41. Моноклональне антитіло або його фрагмент згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарат згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтична композиція згідно з варіантом здійснення 39 для застосування в лікуванні таупатії.

42. Моноклональне антитіло або його фрагмент, препарат або фармацевтична композиція

відповідно до варіанта здійснення 41, де таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), кортикобазальної дегенерації (CBD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, і психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тількими Леві.

5 43. Застосування моноклонального антитіла або його фрагмента згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарату згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтичної композиції згідно з варіантом здійснення 39 у виробництві лікарського препарату для лікування таупатії.

10 44. Застосування моноклонального антитіла або його фрагмента, препарату або фармацевтичної композиції відповідно до варіанта здійснення 43, де таупатія вибрана з групи, що складається з хвороби Альцгеймера, хвороби аргірофільних зерен (AGD), прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), кортикобазальної дегенерації (CBD), психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, і психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тількими Леві.

15 45. Спосіб лікування хвороби Альцгеймера або інших таупатій у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає введення моноклонального антитіла або його фрагмента згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарату згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтичної композиції згідно з варіантом здійснення 39 вказаному суб'єктові в ефективній кількості.

46. Спосіб відповідно до варіанта здійснення 45, де лікування є тривалим.

20 47. Спосіб відповідно до варіанта здійснення 46, де тривале лікування продовжують щонайменше протягом 2 тижнів, як, наприклад, щонайменше протягом 1 місяця, 6 місяців, 1 року або довше.

48. Спосіб відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 45-47, де суб'єктом є людина.

25 49. Набір, що містить моноклональне антитіло або його фрагмент згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарат згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтичну композицію згідно з варіантом здійснення 39, для застосування в медицині.

30 50. Моноклональне антитіло або його фрагмент згідно з будь-яким з варіантів здійснення 1-31, препарат згідно з будь-яким з варіантів здійснення 37-38 або фармацевтична композиція згідно з варіантом здійснення 39 для застосування у виявленні наявності або вимірюванні кількості вказаного тау-білка в головному мозку суб'єкта.

51. Моноклональне антитіло або його фрагмент, препарат або фармацевтична композиція згідно з варіантом здійснення 50, де вказане виявлення або вимірювання включає візуалізацію *in vivo* вказаного антитіла до тау-білка, зв'язаного з вказаним тау-білком.

35 52. Моноклональне антитіло або його фрагмент, препарат або фармацевтична композиція згідно з варіантом здійснення 50, де вказане виявлення або вимірювання включає візуалізацію *ex vivo* вказаного антитіла до тау-білка або його вказаного фрагмента, зв'язаних з вказаним тау-білком.

40 53. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33) у присутності людського тау-білка, фосфорилизованого по залишку 404, але не фосфорилизованого по залишку 396.

45 54. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, що характеризуються імуноспецифічним зв'язуванням з людським тау-білком, що містить фосфорилований залишок 396, відповідно до наступних критеріїв тестування: i) антитіло практично не зв'язується з нефосфорилованим тау-білком; ii) антитіло практично не зв'язується з тау-білком, фосфорилованим в 404, якщо він при цьому не фосфорилований в 396; iii) антитіло зв'язується з тау-білком, фосфорилованим в 396; i iv) антитіло зв'язується з тау-білком, якщо як 396, так і 404 є фосфорилованими.

50 55. Моноклональне антитіло, вироблення якого індукується у відповідь на дифосфорилований пептид TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVSGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R, або його епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33).

55 56. Моноклональне антитіло відповідно до варіанта здійснення 55, де гібридами піддаються скринінгу з використанням людського патологічного і непатологічного тау-білка для виділення клонів, які як i) є імуноспецифічними стосовно будь-якого з фосфорилованих епітопів S396, так і ii) специфічно розпізнають гіперфосфорилований тау-білок з головного мозку людей з хворобою Альцгеймера, де вказані антитіла здатні розрізняти патологічний і непатологічний людський тау-білок.

60 57. Спосіб видалення гіперфосфорилизованого тау-білка з клубка, при цьому вказаний клубок

містить гіперфосфорилований тау-білок, при цьому вказаний спосіб включає приведення гіперфосфорилизованого тау-білка в контакт з антитілом, при цьому вказане антитіло є селективним стосовно тау-білка, що має фосфорилований залишок 396, так, щоб в результаті отримати 90 % виснаження клубка по гіперфосфорилизованому тау-білку.

5 58. Спосіб затримки прогресу хвороби Альцгеймера у пацієнта, при цьому вказаний спосіб включає зменшення або ослаблення накопичення патологічного тау-білка у вказаного пацієнта, при цьому вказаний спосіб включає введення антитіла, яке видаляє тау-білки з фосфорилованим залишком 396.

10 59. Спосіб затримки прогресу хвороби Альцгеймера у пацієнта, при цьому вказаний спосіб включає видалення тау-білків, з яких шляхом затравлювальної дії утворюються патологічні тау-білки, при якому видаляють тау-білки, що мають фосфорилований залишок 396.

60. Спосіб лікування пацієнта з хворобою Альцгеймера, який включає видалення гіперфосфорилизованого тау-білка з клубка, при цьому вказаний клубок містить гіперфосфорилований тау-білок і нормальний тау-білок, шляхом приведення  
15 гіперфосфорилизованого тау-білка в контакт з антитілом, селективним відносно тау-білка, що має фосфорилований залишок 396.

61. Спосіб відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 57-59, який включає застосування антитіла, визначеного в будь-якому з варіантів здійснення 1-31, 40-42 або 50-56.

20 62. Виділене моноклональне антитіло або його виділений епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33).

63. Рекombінантне людське або рекombінантне гуманізоване моноклональне антитіло або його виділений епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33).

25 64. Рекombінантне моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, вироблення яких індукується у відповідь на дифосфорилований пептид TDHGAEIVYK<sup>(p)</sup>SPVVS<sup>(p)</sup>SGDT<sup>(p)</sup>SPRHL (SEQ ID NO: 37), що охоплює залишки 386-410 тау-білка 2N4R, де вказане рекombінантне моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського  
30 тау-білка (SEQ ID NO: 33).

65. Фармацевтична композиція, яка містить виділене моноклональне антитіло або його виділений епітопзв'язувальний фрагмент, де вказане виділене моноклональне антитіло або його виділений епітопзв'язувальний фрагмент визначені в будь-якому з наведених вище варіантів здійснення.

35 66. Химерне моноклональне антитіло або його виділений епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33).

40 67. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, визначені в будь-якому з варіантів здійснення 1-31 і 51-56, які були отримані або вироблені в клітинній лінії, такий як клітинна лінія людини, клітинна лінія ссавця, відмінного від людини, клітинна лінія комахи, дріжджів або бактерії.

45 68. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відповідно до варіанта здійснення 67, отримані в клітинній лінії CHO, клітинній лінії HEK, клітинній лінії BHK-21, клітинній лінії миші (такий як клітинна лінія мієломи), клітинній лінії фібросаркоми, клітинній лінії PER.C6, клітинній лінії НКВ-11, клітинній лінії CAP і клітинній лінії людини HuH-7.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Імунізація мишей фосфорилованими пептидами 396/404

Мишей (C56/BL6 і FVB) імунізували 10 мкг фосфорилизованого тау-білка 386-408 (pS396/pS404) (SEQ ID NO: 37), кон'югованого з P30, в складі з ад'ювантом TiterMax.

50 Миші були самками і самцями з ліній C56/BL6 і FVB. Мишей у віці 2-3 місяців імунізували фосфорилованим тау-білком 386-408, кон'югованим з пептидним епітопом P30.

Імуногенний фосфорилований пептид тау-білка 386-408 (pS396/pS404), кон'югований з P30, змішували з TiterMax (400 мкг/мл пептиду в суміші 1:1 об.:об.) згідно з протоколом постачальника TiterMax і мишам підшкірно ін'єктували 20 мкг антигенного пептиду (100 мкл).  
55 Контрольним мишам ін'єктували тільки ад'ювант. Всіх мишей, імунізованих пептидом, піддавали повторній імунізації 0,5 мкг пептиду/TiterMax (10 мкг/мл пептиду, змішаного, як описано вище, і ін'єктованого) з місячними інтервалами. На закінчення мишей піддавали повторній імунізації фосфорилованим тау-білком 386-408 (pS396/pS404), кон'югованим з P30, без TiterMax за 3 дні до злиття спленоцитів з клітинами SP-2. Гібридами відбирали для циклів повторного  
60 клонування після того, як вони проявляли позитивне зв'язування з планшетами для ELISA, які

були покриті 1 мкг/мл фосфорилованого тау-білка 386-408 (pS396/pS404), і проявляли активність переважного зв'язування з антигенами S1 і P3 з лізату головного мозку суб'єктів з AD і TG4510 (як описано нижче в прикладі 3). Таке зв'язування порівнювали з активністю зв'язування таких антитіл з лізатом головного мозку від контрольних суб'єктів за допомогою дот-блот-аналізів і планшетів для ELISA або MSD, покритих лізатом головного мозку.

#### Приклад 2. Утворення гібридом

Мишей піддавали повторній імунізації фосфорилованим тау-білком 386-408 (pS396/pS404), кон'югованим з P30, без TiterMax за 3 дні до злиття спленоцитів з клітинами SP-2. Гібридами відбирали для циклів повторного клонування після позитивного зв'язування в планшетах для ELISA, покритих 1 мкг/мл фосфорилованого тау-білка 386-408 (pS396/pS404), і прояву активності переважного зв'язування з антигенами S1 і P3 з лізату головного мозку суб'єктів з AD і TG4510 в порівнянні з лізатом головного мозку від контрольних суб'єктів за допомогою дот-блот-аналізів і планшетів для ELISA або MSD, покритих лізатом головного мозку.

#### Приклад 3. Вестерн-блот-аналіз і дот-блот-аналіз специфічних антитіл

##### Біохімічне фракціонування тау-білка

Тканини головного мозку людей або мишей rTg4510, що надмірно експресують людський тау-білок з мутацією P301L, гомогенізували в 10 об'ємах Tris-сольового буферного розчину, що містить інгібітори протеаз і фосфатаз, як вказано далі: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 274 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 % суміш інгібіторів протеаз (Roche); 1 % коктейль інгібіторів фосфатаз I і II (Sigma) і 1 mM фенілметилсульфонілфторид (PMSF; Sigma). Гомогенати центрифугували при 27000 x g протягом 20 хв. при 4 °C з отриманням фракцій надосадової рідини (S1) і осаду. Зразки осаду повторно гомогенізували в 5 об'ємах буфера з високою концентрацією солі/сахарози (0,8 M NaCl, 10 % сахароза, 10 mM Tris/HCl, [pH 7,4], 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) і центрифугували, як описано вище. Зразки надосадової рідини збирали і інкубували з саркозилем (кінцева концентрація 1 %; Sigma) протягом години при 37 °C з подальшим центрифугуванням при 150000 x g протягом години при 4 °C з отриманням зразків осаду, нерозчинних в саркозилі, що називаються фракцією P3. Осад P3 ресуспендували в буфері TE (10 mM Tris/HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) до об'єму, рівного половині початкового об'єму, використовуваного для гомогенатів головного мозку.

##### Вестерн-блот- і дот-блот-аналізи

Фракціоновані екстракти тканин S1 і P3 розчиняли в SDS-буфері для зразка, що містить 0,1 M DTT. Піддані тепловій обробці зразки (95 °C протягом 10 хв.) розділяли за допомогою геле-електрофорезу в 4-12 % Bis-Tris-гелях для SDS-PAGE (Invitrogen) і переносили на мембрани з PVDF (BioRad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія). Зразки для дот-блотингу наносили плямами безпосередньо на нітроцелюлозні мембрани (Amersham, Пітсбург, Пенсільванія) у відомих концентраціях для всіх зразків. Мембрани як для вестерн-блотингу, так і для дот-блотингу блокували в 5 % знежиреному сухому молоці в TBS-Tween (0,5 %) з pH 7,4 з подальшою інкубацією в 1 мкг/мл D1.2 або C10-2 протягом ночі при 4 °C. Мембрани промивали і інкубували з антитілом до мишачого IgG, кон'югованим з пероксидазою (1:5000; Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсільванія). Зв'язані антитіла виявляли за допомогою системи посиленої хемілюмінесценції (набір ECL PLUS; PerkinElmer). Кількісну оцінку і візуальний аналіз імунореактивності в рамках вестерн-блотингу і дот-блотингу виконували за допомогою підключеної до комп'ютера аналітичної системи біовізуалізації LAS-4000 (Fujifilm, Токіо, Японія) і програмного забезпечення Multi Gauge v3.1 (Fujifilm). Білкові навантаження коректували за об'ємом початкових фракцій, і його можна перетворити на початкову сиру масу тканини. Результати показані на фігурі 1 і фігурі 2.

Приклад 4. Скринінг і відбір антитіл до 396/404 із застосуванням іммобілізованого людського патологічного матеріалу

Зразки надосадової рідини культур гібридом піддавали скринінгу відносно зв'язування антитіл в планшетах Nunc, покритих 1 мкг/мл фосфорилованого пептиду тау-білка 386-408 (pS396/pS404), із застосуванням 0,1 M карбонатного буфера з pH 9.

Позитивні зразки надосадової рідини потім розбавляли 1:50-1:800 в PBS, 0,1 % BSA і 0,1 % NP40 для зв'язування в планшетах для ELISA або MSD, покритих антигенами лізату головного мозку (осадом P3, див. приклад 3) від уражених AD і здорових контрольних суб'єктів (HC), відповідно. Антигени лізату головного мозку розбавляли в 1500 разів в 0,1 M карбонатному буфері з pH 9 перед інкубацією/покрыттям планшетів для ELISA або MSD. Лунки потім блокували протягом 2 годин при кімнатній температурі (PBS, 3 мг/мл BSA, 0,1 % NP-40), і активність зв'язування антитіл виявляли за допомогою антитіла до мишачого IgG, кон'югованого з HRP (DAKO) і SULFO-TAG (MSD № продукту), згідно з протоколом постачальника. Вибрані антитіла (D1-2, C5-2, C8-3 і C10-2), розбавлені в PBS з 0,1 % BSA, характеризувалися

дозозалежним ефектом і демонстрували активність зв'язування з планшетами, покритими антигеном AD-P3, від субнанолярної до нанолярної, і додатково характеризувалися активністю зв'язування з вибраними специфічними і контрольними пептидами. Результати показані на фігурі 3.

5      Приклад 5. Специфічність стосовно пептидів і афінність зв'язування з ними

Антитіла, що характеризуються позитивним зв'язуванням з патологічним тау-білком, додатково характеризували стосовно уявної афінності (IC<sub>50</sub>) і селективності/специфічності стосовно ряду фосфорилованих пептидних епітопів (p). Планшети для MSD покривали 100 нг/мл фосфорилизованого тау-білка 386-408 (pS396/pS404), як описано вище. Антитіла до фосфорилизованого тау-білка аналізували в аналізах залежності доза-відповідь для визначення концентрацій антитіл, що забезпечують належний рівень аналітичного сигналу (у типовому випадку 5000-20000 RU в MSD, що відповідає 0,5-2 % від максимального апаратного сигналу, або сигнали оптичної щільності (OD) 1,0-1,5 при 450 нм в ELISA). Вибрані антитіла інкубували з фосфорилованим тау-білком 386-408 (pS396/404) в концентраціях (0-1000 нМ), що ступінчасто змінюються, протягом 2 годин при кімнатній температурі. Реакційні суміші потім наносили на покриті пептидом планшети для MSD, покриті 100 нг/мл фосфорилизованого пептиду тау-білка 386-408 (pS396/pS404), як описано вище, і вимірювали активність зв'язування. Значення IC<sub>50</sub> з аналізів інгібування відповідають значенням уявної афінності (K<sub>D</sub>), що становлять 10-100 нМ.

Специфічність і фосфоселективність. Моноклональне антитіло в належній концентрації інкубували з 100 нМ дифосфорилизованого (pS396/pS404), нефосфорилизованого або монофосфорилизованого (pS396 або pS404) фосфорилизованого тау-білка 386-408 і аналізували стосовно активності зв'язування (у аналізах інгібування). Контрольні фосфориловані пептиди тау-білка (фосфорилований тау-білок 260-270 (pS262) або фосфорилований тау-білок 240-270 (pS262)) і рекомбінантний нефосфорилований тау-білок аналізували для порівняння. Всі антитіла, що позитивно реагують з антигеном AD-P3, демонстрували сильну перевагу до фосфорилизованого пептиду тау-білка 386-408 (pS396/pS404) і монофосфорилизованого пептиду фосфорилизованого тау-білка 386-408 (pS396) і відсутність активності зв'язування з монофосфорилованим пептидом фосфорилизованого тау-білка 386-408 (pS404) і нефосфорилованим пептидом тау-білка 386-408. Фосфориловані пептиди тау-білка 240-270 і фосфорилований тау-білок були контрольними. Результати показані на фігурі 4 і фігурі 32.

Приклад 6. Отримання характеристик антитіл гістологічними методами за допомогою імуногістохімічного дослідження

Тканини головного мозку мишей брали від мишей rTg4510 у віці 8 місяців (надмірно експресуючих людський тау-білок P301L під контролем промотору CamKII) і нетрансгенних тварин одного приплоду (відмінних від Tg), фіксували в 4 % параформальдегіді і заливали в парафін. Залиті в парафін зразки лобної долі кори головного мозку людини придбали у Tissue Solutions (Глазго, Великобританія). Тканину від донорів з діагностованою кінцевою стадією хвороби Альцгеймера порівнювали з тканиною від не уражених деменцією контрольних донорів у відповідній віковій групі. Зрізи товщиною 4 мкм депарафінували і піддавали демаскуванню антигену шляхом мікрохвильової обробки зрізів в 10 мМ цитратному буфері, pH 6, протягом 10 хвилин. Ендогенні пероксидази блокували за допомогою 1 % гідропероксидази, а потім 5 % нормальної свинячої сироватки крові в PBS/1 % BSA/0,3 % Triton X-100 (PBS-BT). Зрізи інкубували протягом ночі при 4 °C з антитілами D1.2 і C10-2, розбавленими PBS-BT в діапазоні концентрацій. Зрізи промивали в PBS, 0,25 % BSA, 0,1 % Triton X-100 перед інкубацією з біотинілованим вторинним свинячим антитілом до мишачих імуноглобулінів (E0464; DAKO, Глоструп, Данія) при 1:500 протягом 1 години. Після додаткового промивання застосовували набір для утворення комплексу стрептавідин-біотин (Vector Laboratories, Бурлінгем, Каліфорнія) і візуалізували імунореактивність за допомогою діамінобензидину. Зрізи піддавали контрастному забарвленню гематоксиліном. Результати показані на фігурі 5.

50      Приклад 7. Селективність антитіл стосовно патологічного тау-білка

Планшети для MSD покривали солюбілізованими антигенами P3 з головного мозку суб'єкта з AD (розбавленими 1:1500) або головного мозку TG4510 (розбавленими 1:3000). Результати показані на фігурі 6.

Виявлення виконують згідно з описаним в прикладі 4 вище.

55      Приклад 8. Аналіз затравлювальної дії в клітинах HEK

Клітини HEK293 піддавали транз'єнтній трансфекції людським тау-білком P301L-FLAG в 6-лункових планшетах через 24 години після посіву з наступною через 24 години інкубацією з гомогенатом головного мозку протягом 24 годин з подальшим розділенням і пересіванням клітин і збором через додаткові 24 години. Клітини лізували і піддавали ультразвуковій обробці в PBS, доповненому буфером з 1 % Triton-X, інгібітором фосфатаз PhosSTOP і інгібітором

протеаз complete (Roche), і ультрацентрифугували при 100000 x g протягом 30 хвилин. Осад ресуспендували в SDS, піддавали ультразвуковій обробці і ультрацентрифугували протягом 30 хвилин при 100000 x g. Зразки надосадової рідини аналізували за допомогою вестерн-блотингу. Клітини, що експресують людський тау-білок P301L, продемонстрували наявність нерозчинного (фракція SDS, виявлення за допомогою E1/FLAG) гіперфосфорилизованого (виявлення за допомогою D1.2)pS396) тау-білка при затравлюванні загальними гомогенатами головного мозку від мишей rTg4510, трансгенних по тау-білку. Клітини, оброблені гомогенатом контрольного головного мозку мишей, продемонстрували відсутність агрегованого гіперфосфорилизованого людського тау-білка. Додатково, загальні клітинні лізати клітин HEK293 аналізували за допомогою аналізу агрегації тау-білків від Cisbio. У основі цього аналізу лежить флуоресценція з розрізненням за часом із застосуванням одного і того ж антитіла як донорного (кон'югованого з Tb3+), так і акцепторного (кон'югованого з d2) антитіла в FRET. Зразок об'ємом 10 мкл змішували з сумішшю антитіл об'ємом 10 мкл і інкубували протягом 20 годин. Планшет прочитували на планшет-рідері Pherastar для оцінки флуоресценції з розрізненням за часом (вимірюють рівень агрегованого тау-білка після включення збуджуючого світла сигналу FRET). У аналізі вимірюють рівень агрегованого тау-білка як в людському секційному матеріалі, так і у мишей rTg4510 і в клітинах HEK із затравкою з високою специфічністю і чутливістю. Результати показані на фігурі 7 і демонструють, що на затравлювальний ефект не впливала обробка за допомогою HEL, але він частково усувався шляхом обробки антитілами до тау-білка (C10-2 > D1.2 > hAC136-2B6-Ab1).

Приклад 9. Усунення функціональної (електрофізіологічної (ел.-фіз.)) відповіді in vivo для D1.2 і C10-2

Електрофізіологічна оцінка синаптичної передачі і пластичності в CA1-зоні гіпокампу у мишей rTg4510 і контрольних мишей tTA у віці 4,5-5,5 місяців in vivo показала: i) значне погіршення базальної синаптичної передачі у мишей rTg4510 в порівнянні з tTA та ii) значне зменшення парного полегшення у мишей rTg4510 в порівнянні з tTA.

Всі експерименти проводили відповідно до Директиви Ради Європейського Союзу (86/609/EEC) про догляд за лабораторними тваринами і їх використання і законодавства Данії, регулюючого проведення експериментів на тваринах.

У цьому дослідженні використовували самців мишей rTg4510 і tTA (Taconic Europe A/S) у віці 5-5,5 місяців на момент реєстрації даних. Мишей утримували групами в умовах регульованої температури ( $22 \pm 1,5$  °C) і вологості (55-65 %) і витримували при циклі чергування світла і темряви 12:12 годин (світло включали о 06:00 години). Їжа і вода були доступні без обмежень.

Тварин анестезували шляхом внутрішньочеревної (i.p.) ін'єкції уретану (1,2 г/кг). Мишей потім фіксували в стереотаксичній рамці, їх температуру доводили до 37,5 °C за допомогою електричної грілки і оголяли череп. На лобну кістку поміщали платиновий дріт, виступаючий як еталонний електрод, і просвердлювали додатковий отвір для введення реєструючого і стимулюючого електродів в гіпокамп за наступними координатами згідно з атласом Paxinos і Franklin (Paxinos and Franklin, 2001): реєструючий - на 1,5-1,7 мм назад від брегми, на 1,0-1,2 мм латерально від серединної лінії, на 1,4-1,7 мм нижче за поверхню головного мозку; стимулюючий - на 1,8-2,0 мм назад від брегми, на 1,5-1,7 мм латерально від серединної лінії, на 1,3-1,7 мм нижче за поверхню головного мозку. Тварин залишали в стереотаксичній рамці протягом всього періоду реєстрації даних, а їх рівень анестезії регулярно перевіряли.

Польові збуджуючі постсинаптичні потенціали (fEPSP) викликали в CA1 шляхом електростимуляції колатералі Шеффера кожні 30 с, а глибину розташування реєструючого електроду коректували до тих пір, поки у відповідь на монополярний прямокутний імпульс не був зареєстрований негативний fEPSP. Вимірний градієнт викликаного fEPSP в типовому випадку складав від 30 до 70 % максимальної амплітуди fEPSP.

Після індукції оптимального fEPSP оцінювали базальну синаптичну передачу за залежністю між інтенсивністю стимуляції і градієнтом викликаного fEPSP (залежність "вхід-вихід"). Різні значення інтенсивності стимуляції становили 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 і 500 мкА, і їх послідовно прикладали в порядку зростання з 2-3 повторами для кожного значення інтенсивності. Було виявлено, що базальна синаптична передача значно погіршувалася у мишей rTg4510 в порівнянні з tTA.

Парне полегшення - короткострокову синаптичну пластичність, в основі якої, як вважають, знаходяться пресинаптичні механізми - додатково вимірювали у мишей rTg4510 і tTA. Стисло, до колатералі Шеффера прикладали пару стимулів з інтервалом між стимулами (ISI), що варіюються від 25 до 1000 мс, і градієнт другого fEPSP порівнювали з градієнтом першого fEPSP. Полегшення спостерігали при всіх ISI з максимальним полегшенням при ISI, що становить 50 і 75 мс. Цікаво, що у мишей rTg4510 спостерігали значно нижче PPF в порівнянні з

мишами tTA.

Ідентифіковані погіршення базальної синаптичної передачі і парного полегшення у мишей rTg4510 додатково використовували як показники, які можна реєструвати для тестування ефективності антитіл.

5 Реєстрацію даних виконували в усіх експериментах через 2-4 дні після введення 4 доз антитіла двічі на тиждень протягом 2 тижнів і.р. У кожної тварини, за наявності можливості, в гіпокампі реєстрували як базальну синаптичну передачу, так і парне полегшення, які додатково використовували в окремих експериментах. Результати показані на фігурі 8 і демонструють усунення антитілами дефіцитів парного полегшення і базальної синаптичної передачі при викликаних польових потенціалах в CA1.

Приклад 10. Імуновиснаження екстрактів з головного мозку rTg4510 по тау-білку

60 мкг мишачого і гуманізованого антитіла C10-2 іммобілізували на магнітних гранулах Dynabeads в 300 мкл суспензії (набір для імунопреципітації Dynabeads з білком G Novex № за кат. 10007D). Після ретельного промивання гранули змішували з 60 мкл екстракту з головного мозку rTg4510 і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Магнітні гранули відокремлювали від екстракту і екстракти аналізували за допомогою вестерн-блотингу. При виснаженні за допомогою mC10-2 і hC10-2 було видалено, відповідно, 99 % і 99,5 % агрегатів тау-білка. Результати показані на фігурі 12.

Приклад 11. Аналіз затравлювальної дії в клітинах НЕК із застосуванням імуновиснажених екстрактів

Клітини НЕК293 транз'єнтно трансфектували людським тау-білком P301L-FLAG в 6-лункових планшетах. Через 24 години клітини інкубували з гомогенатом головного мозку, який був підданий імуновиснаженню за допомогою гуманізованого або мишачого C10-2. Через 24 години клітини пересівали і збирали через додаткові 24 години. Клітини лізували і піддавали ультразвуковій обробці в TBS, доповненому 1 % Triton-X, інгібіторами фосфатаз і протеаз (Roche), і ультрацентрифугували при 100000 x g протягом 30 хвилин. Осад ресуспендували в 1 % SDS, піддавали ультразвуковій обробці і ультрацентрифугували протягом 30 хвилин при 100000 x g. Зразки надосадової рідини аналізували за допомогою вестерн-блотингу. Клітини, що експресують людський тау-білок P301L, продемонстрували наявність нерозчинного (фракція SDS, виявлення за допомогою E1/FLAG) гіперфосфорилизованого тау-білка (D1.2/тау-білок pS396, прогін при вищій молекулярній масі) при затравці загальними гомогенатами головного мозку від мишей rTg4510, трансгенних по тау-білку. Клітини, оброблені гомогенатом контрольного головного мозку мишей tTA, продемонстрували відсутність агрегованого гіперфосфорилизованого людського тау-білка. Додатково, загальні клітинні лізати клітин НЕК293 аналізували за допомогою аналізу агрегації тау-білків від Cisbio. Виснаження за допомогою антитіл HEL і hHEL не впливало на затравлювальну дію, тоді як виснаження за допомогою mC10-2 і hC10-2 попереджало агрегацію тау-білка на 88 % і 96 %, а нерозчинного тау-білка на 97 % і 100 %, відповідно. Результати показані на фігурі 13.

Приклад 11. Імуновиснаження екстрактів з головного мозку rTg4510 по тау-білку

100 мкг мишачих антитіл C10-2, D1.2 і Tau5 (Invitrogen) іммобілізували на магнітних гранулах Dynabeads в 500 мкл суспензії (набір для імунопреципітації Dynabeads з білком G Novex № за кат. 10007D). Після ретельного промивання гранули змішували з 100 мкл екстракту з головних мозків rTg4510 і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Магнітні гранули відокремлювали від екстракту і екстракти аналізували за допомогою вестерн-блотингу. C10-2 і D1.2 не видаляють нормальний тау-білок з гомогенатів, як це робить комерційно доступне антитіло Tau5. На відміну від цього, два антитіла за цим винаходом специфічно видаляють гіперфосфорилований тау-білок (64 кДа), тобто тау-білок, фосфорилований по серину-396, на 95 %. Результати показані на фігурі 14.

Приклад 12. Імуновиснаження екстрактів з головного мозку суб'єктів з хворобою Альцгеймера по тау-білку

100 мкг мишачих антитіл C10-2 і D1 іммобілізували на магнітних гранулах Dynabeads в 500 мкл суспензії (набір для імунопреципітації Dynabeads з білком G Novex № за кат. 10007D). Після ретельного промивання гранули змішували з 100 мкл екстракту з головного мозку суб'єктів з хворобою Альцгеймера і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Магнітні гранули відокремлювали від екстракту і екстракти аналізували за допомогою вестерн-блотингу. D1.2 і C10-2 видаляють лише дуже невелику частину загального тау-білка в гомогенаті головного мозку (8 %). Ці антитіла, проте, специфічно видаляють гіперфосфорилований тау-білок (90 %), специфічний для пацієнтів з AD. Результати показані на фігурі 15.

Приклад 13. Затравлювальна дія у мишей rTg4510 із застосуванням імуновиснажених екстрактів

Використовували трансгенних мишей, що експресують людський мутантний тау-білок (P301L 0N4R) під контролем елементу відповіді Tet-Off в CamK2-позитивних нейронах (rTg4510). У цій моделі патологія тау-білка зазвичай починає розвиватися у віці 3 місяців, але при згодовуванні матерям доксицикліну під час вагітності і протягом перших 3 тижнів життя мишеня патологія розвивається на пізнішій стадії (починаючи з віку 6 місяців). Використовували в даних дослідженнях миші, заздалегідь оброблені доксицикліном, мали вік 2,5 місяця у момент часу, що відповідає ін'єкції. Миші отримували анестезію, будучи зафіксованими в стереотаксичній рамці, шляхом вдихання ізофлурану. Череп оголяли і його положення вирівнювали, поки брегма і лямбда не розташувалися на одному рівні. У черепі просвердлювали отвір на 2 мм латерально (справа) і на 2,4 мм назад від брегми. Шприц на 10 мкл зі скошеним наконечником (SGE) застосовували для ін'єкції матеріалу затравки на 1,4 мм вентрально поверхні головного мозку за вищезгаданими координатами. 2 мкл імуновиснажених екстрактів, описаних в прикладах 11 і 12, поволі подавали в необхідне місце (1 мкл/хвилину) і шприц залишали на 5 хвилин перед його видаленням. Рану закривали швами, і мишей зігрівали, поки вони прокидалися. Мишей доглядали протягом 3 місяців, а потім убивали і піддавали перфузійній фіксації за допомогою 4 % PFA.

Імуногістохімічне дослідження. Фіксовані головні мізки розрізали на коронарні зрізи товщиною 35 мкм в NSA і кожен 6-й зріз забарвлювали для виявлення клубків тау-білка (срібний барвник за Gallyas) і для виявлення гіперфосфорилованого тау-білка (AT8). Позитивно забарвлені нейрони (соми) підраховували на іпси- і контралатеральній сторонах гіпокампу в усіх головних мозках. Були включені всі підділянки гіпокампу. Підрахунок проводили у восьми зрізах на головний мозок. Результати відображають сумарну кількість позитивних нейронів з 8 зрізів. У 2 мишей, не підданих ін'єкції, визначали фоновий сигнал. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка. Результати показані на фігурі 16. Показана кількісна оцінка патології тау-білка в головному мозку rTg4510 із затравкою з гомогенатів головного мозку rTg4510 (A) або з AD (B). Перед введенням затравки рівень гіперфосфорилованого тау-білка, але не нормального тау-білка, був зменшений в гомогенатах на 90-95 % шляхом застосування C10-2 або D1.2. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів гомогенати більше не індують затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка.

Гомогенати з головного мозку rTg4510 або суб'єктів з хворобою Альцгеймера здатні індукувати затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка у мишей rTg4510 на стадії, на якій ендегенна патологія тау-білка не розвивалася. При видаленні гіперфосфорилованого тау-білка з гомогенатів шляхом застосування D1.2 або C10-2, як описано в прикладах 11 і 12, активність затравлювальної дії усувається.

Приклад 14. Обробка антитілами мишей rTg4510 із затравкою

Мишей rTg4510, оброблених доксицикліном (як описано в прикладі 13), піддавали тривалій обробці мишачим антитілом D1.2 або контрольним антитілом при 15 мг/кг/тиждень, починаючи з віку 2 місяців. У віці 2,5 місяців екстракт з головного мозку rTg4510 інфузували в гіпокамп (як описано в прикладі 13). Мишей убивали через 1, 2 і 3 місяці після інфузії в головний мозок, а імуногістохімічне дослідження і подальший аналіз виконували згідно з описаним в прикладі 13. При обробці за допомогою D1.2 патологія тау-білка була значно меншою через 2 і 3 місяці після початку затравлювальної дії. Результати показані на фігурі 17.

Показана кількісна оцінка нейронів, що містять клубки, в гіпокампах мишей rTg4510 із затравкою. Патологія збільшується з часом, але при обробці мишей за допомогою D1.2 патологія є значно меншою через 2 і 3 місяці після введення затравки. Показана кількісна оцінка нейронів, що містять клубки, в гіпокампах мишей rTg4510 із затравкою. Патологія збільшується з часом, але при обробці мишей за допомогою D1.2 патологія є значно меншою через 2 і 3 місяці після введення затравки.

Гомогенати з головного мозку rTg4510 або суб'єктів з хворобою Альцгеймера здатні індукувати затравлювальну дію з формуванням патології тау-білка у мишей rTg4510 на стадії, на якій ендегенна патологія тау-білка не розвивалася. Шляхом системної обробки мишей за допомогою D1.2 можна значно зменшити розвиток патології тау-білка.

Приклад 15. Імуновиснаження екстрактів з головного мозку суб'єктів з хворобою Альцгеймера по тау-білку за допомогою гуманізованих антитіл до тау-білка

100 мкг мишачого і гуманізованого C10-2, а також антитіл 2.10.3 і HJ8.5 з попереднього рівня техніки (джерел) іммобілізували на магнітних гранулах Dynabeads в 500 мкл суспензії (набір для імунопреципітації Dynabeads з білком G Novex № за кат. 10007D). Після ретельного промивання гранули змішували з 100 мкл екстракту з головного мозку суб'єктів з хворобою Альцгеймера і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Магнітні гранули відокремлювали від



екстракту і екстракти аналізували за допомогою вестерн-блотингу і аналізу Cisbio. Мишаче і гуманізоване C10-2 ефективно видаляли 93 % і 97 % фосфорилованого тау-білка pS396, але тільки 22 % і 17 % загального тау-білка в порівнянні з контрольним антитілом hHEL. Антитіло 2.10.3 видаляло 91 % тау-білка, фосфорилованого по серину-396, і 10 % загального тау-білка.

Здається, що 2.10.3 є менш ефективним у видаленні однієї із смуг гіперфосфорилованого білка в порівнянні з антитілами C10-2 (середня смуга, відповідна 64 кДа). Антитіло HJ8.5 має абсолютно інший профіль в порівнянні з антитілами як C10-2, так і 2.10.3, видаляючи велику частину тау-білка, 89 % загального тау-білка і 88 % тау-білка pS396. Результати показані на фігурах 23-24.

Приклад 16. Імуновиснаження екстрактів з головного мозку суб'єктів з хворобою Альцгеймера по агрегованому тау-білку за допомогою гуманізованих антитіл до тау-білка

Імуновиснажені екстракти від суб'єктів з AD, описані в прикладі 13, також аналізували шляхом застосування аналізу агрегації тау-білків, описаного в прикладі 10. Антитіла C10-2 і HJ8.5 ефективніше видаляють агрегований тау-білок з матеріалу від суб'єктів з AD, ніж антитіло 2.10.3. В порядку зменшення ефективності: HJ8.5 (99 %), hC10-2 (98 %), mC10-2 (96 %) і 2.10.3 (90 %), в усіх випадках в порівнянні з антитілом hHEL. Результати показані на фігурі 25.

Приклад 17. Імуновиснаження по тау-білку

25 мкг антитіла (гуманізованого C10-2 або 2.10.3) іммобілізували на магнітних гранулах Dynabeads в 125 мкл суспензії (набір для імунопреципітації Dynabeads з білком G Novex № за кат. 10007D). Після ретельного промивання покриті гранули змішували з різними кількостями непокритих промитих гранул. Починали з 100 % гранул, покритих Ab, що відповідало 5 мкг антитіла, із зниженням до 100 % непокритих гранул. Загальна кількість гранул була однаковою в усіх зразках. Гранули змішували з 20 мкл екстракту від суб'єктів з AD і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Магнітні гранули відокремлювали від екстракту і екстракти розділяли на аліквоти, піддавали миттєвому заморожуванню і витримували при -80 C до застосування.

Аналіз виснаження за допомогою вестерн-блотингу

Зразки кип'ятили в 1x завантажувальному LDS-буфері і 100 мМ DTT. Об'єм, відповідний 3 мкл екстрактів, завантажували в 4-12 % Bis-Tris-гель NuPAGE (Life Tech, Novex). Після електрофорезу білки блотували на мембрану Immobilon-FL з PVDF (0,45 мкм, IPFL10100, Millipore). Мембрану блокували за допомогою блокуючого буфера SEA (№ продукту 37527, Thermo). Рівні тау-білка і рТау оцінювали в зразках за допомогою Tau5 (ab80579, Abcam, 1:2000), мишачого C10-2 (1 мкг/мл), P-S199/202 (44768G, Invitrogen, 1:1000), P-S422 (ab79415, Abcam, 1:750), людського IPN (1 мкг/мл). GAPDH і актин застосовували як контролю навантаження (ab9484, Abcam, 1:2000, A5441, Sigma, 1:20000). Застосовували вторинні антитіла IgG, кон'юговані з флуорофором (козяче антитіло до людських імуноглобулінів, кон'юговане з IRDye 800CW, козяче антитіло до кролячих імуноглобулінів, кон'юговане з IRDye 800CW, козяче антитіло до мишачих імуноглобулінів, кон'юговане з IRDye 680, LI-COR Biosciences), і сигнал оцінювали кількісно за допомогою Odyssey CLx і програмного забезпечення Image Studio (LI-COR Biosciences).

Проводили кількісну оцінку окремих смуг, а також сигналу в цілих доріжках, і на її підставі будували сигмоїдальні криві залежності доза-відповідь, і, за наявності можливості, оцінювали максимальний ефект і значення EC50.

Результати

Обидва антитіла видаляли невелику частину тау-білка з препарату головного мозку суб'єкта з хворобою Альцгеймера. 2.10.3, сконструйоване таким чином, що воно має специфічність до тау-білка P-S422, видаляє до 24 % від загальної кількості тау-білка, а C10-2 видаляє до 15 % загального тау-білка (див. фігуру 26).

Як 2.10.3, так і C10-2 видаляють більше 90 % тау-білка, фосфорилованого по серину-422, хоча кількість антитіла, необхідна для видалення 50 % тау-білка P-S422, відрізняється: у випадку з 2.10.3 необхідно 0,42 мкг антитіла, а у випадку з C10-2 для досягнення того ж самого ефекту необхідно 0,27 мкг (див. фігуру 27).

C10-2 ефективно видаляє тау-білок, фосфорилований по серину-396 (максимальний ефект: 88 %, і половина цього ефекту досягається при застосуванні 0,30 мкг антитіла). 2.10.3 видаляє меншу частину тау-білка, фосфорилованого по серину-396 (максимальний ефект: 60 %, і половина цього ефекту досягається при застосуванні 0,63 мкг антитіла) (див. фігуру 28). Це указує на те, що весь тау-білок, фосфорилований по серину-422, також є фосфорилованим по серину-396, але існує частина гіперфосфорилованого тау-білка, фосфорилованого по серину-396, в якій відсутній фосфорилований серин в положенні 422.

Значна частина тау-білка, що видаляється C10-2, також є фосфорилованою по серину-

199/202, оскільки 69 % тау-білка, що має таке фосфорилювання, підпадає під вплив імунівиснаження (50 % ефект при застосуванні 0,34 мкг антитіла) (див. фігуру 29). Імунівиснаження за допомогою 2.10.3 не дає сигмоїдальну криву залежності доза-відповідь для тау-білка P-S199/202, хоча при підвищенні кількості антитіла спостерігається зниження інтенсивності сигналу (максимальне зменшення 52 % при застосуванні максимальної кількості антитіла (5 мкг)) (див. фігуру 29).

Ці дані указують на те, що антитіло C10-2, що націлюється на фосфорилований серин-396, зв'язується з більшим пулом гіперфосфорилованих тау-білків, ніж антитіло 2.10.3, що націлюється на фосфорилований серин в положенні 422.

Приклад 18. Опосередковане антитілом інгібування специфічного захоплення mC10-2 патологічних антигенних тау-білків в лізатах головного мозку від суб'єктів з AD

Матеріали і способи

Матеріал

Покриваючий буфер: карбонатний буфер, pH 8,5, 150 mM NaCl. Блокуючий буфер: 3 % BSA (фракція V), 0,1 % NP40 в PBS, pH 7,4. Промивальний буфер: 0,1 % BSA (фракція V), 0,1 % NP40 в PBS, pH 7,4. Гуманізоване загальне козяче антитіло до тау-білка, мічене SULFO-TAG (D221LA-1 MSD, 50 мкг/мл).

Спосіб направлений на вимірювання захоплення патологічних людських антигенних тау-білків з головного мозку суб'єктів з AD із застосуванням планшетів, покритих C10-2 (стадія A), після інкубації антигенних тау-білків з pS396-специфічними антитілами в концентраціях, що підвищуються (стадія B). Захоплення антигенного тау-білка і опосередковане антитілом інгібування виявляли за допомогою мічених SULFO-TAG антитіл до людського (загального) тау-білка від MSD.

A: планшети для MSD покривали (протягом ночі при 4 °C) 0,5 мкг/мл mC10-2 (захоплювального антитіла) в покриваючому буфері і потім блокували протягом 1 години при кімнатній температурі і промивали 3 рази (фігура 30).

B: зразки лізату P3 (1:1000=2-4 мкг/мл загального білка) і/або S1(p) (1:300=20-40 нг/мл загального білка) з матеріалу від суб'єктів з AD (об'єднаного від 3 пацієнтів) змішували з антитілом, специфічним до пептидного епітопу pS396, в концентраціях, що ступінчасто змінюються, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакційні суміші потім інкубували протягом 2 годин в планшетах, підготовлених на стадії A (фігура 31).

C: тау-білок, захоплений C10-2, виявляли за допомогою антитіла до людського тау-білка, міченого SULFO-TAG. Антитіло до тау-білка (1:50) від MSD, що відповідає інструкції виробника. Планшети аналізують на SECTOR® S 600 від MSD. P3 з матеріалу від суб'єктів з AD і S1(p) з матеріалу від суб'єктів з AD тестують згідно з аналогічною схемою (фігура 33/34).

Таблиці 6A-6D: інгібування захоплення антигенного тау-білка

Таблиця 6A

мишаче C10-2			
+ пептид тау-білка, 10 мкМ			
	середнє значення сигналу	сигнал	сигнал
PBS/0,1 % BSA	388	403	373
C10-2, 3 нг/мл	366	384	348
C10-2, 10 нг/мл	383	398	367
C10-2, 30 нг/мл	345	384	306
C10-2, 100 нг/мл	357	401	313
C10-2, 300 нг/мл	407	434	379
C10-2, 1000 нг/мл	451	462	439
C10-2, 10000 нг/мл	870	920	820

Таблиця 6B

мишаче C10-2			
+ PBS/0,1 % BSA			
	середнє значення сигналу	сигнал	сигнал
PBS/0,1 % BSA + PBS	303	293	312
C10-2, 3 нг/мл + PBS	1881	1890	1871
C10-2, 10 нг/мл + PBS	5721	5863	5579
C10-2, 30 нг/мл + PBS	11922	12044	11799
C10-2, 100 нг/мл + PBS	21833	21925	21741
C10-2, 300 нг/мл + PBS	30410	30311	30508
C10-2, 1000 нг/мл + PBS	38524	38233	38814
C10-2, 10000 нг/мл + PBS	51171	51253	51089

Таблиця 6C

мишачий клон PHF 13			
+ пептид тау-білка, 10 мкМ			
	середнє значення сигналу	сигнал	сигнал
PBS/0,1 % BSA	287	286	287
PHF 13, 1000000	280	284	276
PHF 13, 300000	299	305	292
PHF 13, 100000	355	370	340
PHF 13, 30000	481	472	490
PHF 13, 10000 M	953	1019	886
PHF 13, 3000	2182	2279	2084
PHF 13, 1000	6896	7542	6249

Таблиця 6D

мишачий клон PHF 13			
± PBS/0,1 % BSA			
	середнє значення сигналу	сигнал	сигнал
PBS/0,1 % BSA + PBS	281	282	280
PHF 13, 1000000 + PBS	335	358	312
PHF 13, 300000 + PBS	560	568	551
PHF 13, 100000 + PBS	852	856	847
PHF 13, 30000 + PBS	1579	1661	1496
PHF 13, 10000 + PBS	2882	2899	2864
PHF 13, 3000 + PBS	5792	6126	5458
PHF 13, 1000 + PBS	12639	13654	11624

5

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Х. ЛУННБЕК А/С (H. Lundbeck A/S)

<120> Антитіла до тау-білка (396)

<130> 0995-WO-РСТ

10

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна

10

<220>

<223> CDR 1 легкого ланцюга D1.2

<400> 1

15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

20

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

25

<220>

<223> CDR 2 легкого ланцюга D1.2

<400> 2

30

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

35

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

40

<223> CDR 3 легкого ланцюга D1.2

<400> 3

Ser Gln Ser Thr His Val Pro

45

1 5

<210> 4

<211> 13

50

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR 1 важкого ланцюга D1.2

<400> 4

Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Ile His  
5 1 5 10

<210> 5

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR 2 важкого ланцюга D1.2

15

<400> 5

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

20

Gly

25

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна

30

<220>

<223> CDR 3 важкого ланцюга D1.2

<400> 6

35

Ser Arg Gly Phe Asp Tyr

1 5

40

<210> 7

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна

45

<220>

<223> Легкий ланцюг D1.2

<400> 7

50

Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

	20	25	30
5	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
	35	40	45
10	Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
	50	55	60
15	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65	70	75 80
20	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser		
	85	90	95
25	Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	110
30	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
	115	120	125
35	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe		
	130	135	140
40	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg		
	145	150	155 160
45	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170	175
50	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
	180	185	190
55	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
	195	200	205
60	Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
	210	215	
	<210> 8		
	<211> 451		
	<212> PRT		

<213> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг D1.2

5

<400> 8

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

10

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

15

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

20

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

25

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

30

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

Thr Arg Ser Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
100 105 110

35

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
115 120 125

40

Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val  
130 135 140

45

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

50

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

Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser  
180 185 190

Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val  
 195 200 205

5

Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys  
 210 215 220

10

Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly  
 225 230 235 240

15

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met  
 245 250 255

20

Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu  
 260 265 270

25

Asp Asp Pro Asp Val Arg Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val  
 275 280 285

30

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile  
 290 295 300

35

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly  
 305 310 315 320

40

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile  
 325 330 335

45

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

50

Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser  
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu  
 370 375 380

Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro  
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asp Ile



	405	410	415
	Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg		
5	420	425	430
	His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser		
10	435	440	445
	Pro Gly Lys		
	450		
15	<210> 9		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> Штучна		
20	<220>		
	<223> CDR 1 легкого ланцюга C10.2		
	<400> 9		
25	Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn		
	1	5	10
30	<210> 10		
	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> Штучна		
35	<220>		
	<223> CDR 2 легкого ланцюга C10.2		
	<400> 10		
40	Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp		
	1	5	
	<210> 11		
45	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> Штучна		
	<220>		
50	<223> CDR 3 легкого ланцюга C10.2		
	<400> 11		
	Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro		

1 5

5 <210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Штучна

10 <220>  
<223> CDR 1 важкого ланцюга C10.2

<400> 12

15 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His  
1 5 10

20 <210> 13  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Штучна

25 <220>  
<223> CDR 2 важкого ланцюга C10.2

<400> 13

30 Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

35 <210> 14  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Штучна

40 <220>  
<223> CDR 3 важкого ланцюга C10.2

<400> 14

45 Arg Gly Ala Met Asp Tyr  
1 5

50 <210> 15  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг C10.2

<400> 15

5

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

10

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

15

35 40 45

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

50 55 60

20

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp

65 70 75 80

25

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

85 90 95

30

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

35

115 120 125

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

130 135 140

40

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

45

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

50

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

	195	200	205
5	Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
	210		
	<210> 16		
	<211> 439		
10	<212> PRT		
	<213> Штучна		
	<220>		
	<223> Важкий ланцюг C10.2		
15	<400> 16		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
20	1	5	10 15
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg		
	20	25	30
25	Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45
30	Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
35	65	70	75 80
	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
40	85	90	95
	Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr		
	100	105	110
45	Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro		
	115	120	125
50	Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val		
	130	135	140
	Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser		

	145	150	155	160
	Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu			
5	165	170	175	
	Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser			
10	180	185	190	
	Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val			
15	195	200	205	
	Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys			
20	210	215	220	
	Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
25	225	230	235	240
	Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val			
30	245	250	255	
	Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp			
35	260	265	270	
	Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
40	275	280	285	
	Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp			
45	290	295	300	
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe			
50	305	310	315	320
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys			
	325	330	335	
	Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys			
	340	345	350	
	Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp			
	355	360	365	

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys  
370 375 380

5

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser  
385 390 395 400

10

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr  
405 410 415

15

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser  
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435

20

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Штучна

<220>

<223> CDR 1 легкого ланцюга C5.2

30

<400> 17

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

35

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

40

<220>

<223> CDR 2 легкого ланцюга C5.2

<400> 18

45

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp  
1 5

50

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR 3 легкого ланцюга C5.2

<400> 19

5

Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro

1 5

10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна

15

<220>

<223> CDR 1 важкого ланцюга C5.2

<400> 20

20

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His

1 5 10

<210> 21

25

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

30

<223> CDR 2 важкого ланцюга C5.2

<400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Asn Phe Lys

35

1 5 10 15

Gly

40

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

45

<213> Штучна

<220>

<223> CDR 3 важкого ланцюга C5.2

50

<400> 22

Arg Gly Thr Met Asp Tyr

1 5

<210> 23  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> Легкий ланцюг C5.2  
  
 10 <400> 23  
  
 Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 15 Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn  
 20 25 30  
  
 20 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 25 50 55 60  
  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp  
 30 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe  
 85 90 95  
  
 35 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110  
  
 40 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 115 120 125  
  
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 45 130 135 140  
  
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
 145 150 155 160  
  
 50 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
 165 170 175



Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 180 185 190

5

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 195 200 205

10

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

<210> 24  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Важкий ланцюг C5.2

<400> 24

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

25

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

30

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

35

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

40

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

45

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

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

50

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

5

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

10

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

15

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

20

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val  
 195 200 205

25

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys  
 210 215 220

30

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240

35

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val  
 245 250 255

40

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp  
 260 265 270

45

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 275 280 285

50

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp  
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe  
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys  
 325 330 335

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys

	340	345	350
5	Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp		
	355	360	365
10	Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys		
	370	375	380
15	Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser		
	385	390	395 400
20	Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr		
	405	410	415
25	Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser		
	420	425	430
30	Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
	435		
	<210> 25		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> Штучна		
	<220>		
	<223> CDR 1 легкого ланцюга C8.3		
35	<400> 25		
40	Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn		
	1	5	10
	<210> 26		
	<211> 7		
	<212> PRT		
45	<213> Штучна		
	<220>		
	<223> CDR 2 легкого ланцюга C8.3		
50	<400> 26		
	Gly Ser Ser Asn Leu Glu Asp		
	1	5	

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> CDR 3 легкого ланцюга C8.3  
  
 10 <400> 27  
  
 Leu Gln His Ser Tyr Leu Pro  
 1 5  
  
 15  
 <210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Штучна  
 20  
 <220>  
 <223> CDR 1 важкого ланцюга C8.3  
  
 <400> 28  
 25  
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His  
 1 5 10  
  
 30 <210> 29  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Штучна  
  
 35 <220>  
 <223> CDR 2 важкого ланцюга C8.3  
  
 <400> 29  
  
 40 Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 45  
  
 <210> 30  
 <211> 6  
 50 <212> PRT  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> CDR 3 важкого ланцюга C8.3

<400> 30

Arg Gly Ala Met Asp Tyr  
5 1 5

<210> 31

<211> 214

10 <212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг C8.3

15

<400> 31

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

50

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

	145	150	155	160
	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
5	165	170	175	
	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
10	180	185	190	
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
	195	200	205	
15	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
	210			
20	<210> 32			
	<211> 439			
	<212> PRT			
	<213> Штучна			
25	<220>			
	<223> Важкий ланцюг C8.3			
	<400> 32			
30	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Asn Pro Gly Ala			
	1	5	10	15
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg			
35	20	25	30	
	Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
40	35	40	45	
	Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe			
	50	55	60	
45	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
50	Met Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95	
	Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr			

	100	105	110
5	Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro		
	115	120	125
10	Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val		
	130	135	140
15	Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser		
	145	150	155 160
20	Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu		
	165	170	175
25	Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser		
	180	185	190
30	Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val		
	195	200	205
35	Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys		
	210	215	220
40	Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	225	230	235 240
45	Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val		
	245	250	255
50	Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp		
	260	265	270
	Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	275	280	285
	Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp		
	290	295	300
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe		
	305	310	315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys  
325 330 335

5  
Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys  
340 345 350

10  
Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp  
355 360 365

15  
Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys  
370 375 380

20  
Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser  
385 390 395 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr  
405 410 415

25  
Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser  
420 425 430

30  
Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435

35  
<210> 33  
<211> 441  
<212> PRT  
<213> Штучна

40  
<220>  
<223> Людський тау-білок, № 33

<400> 33

45  
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15

50  
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
35 40 45



Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
 50 55 60

5

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80

10

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
 85 90 95

15

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
 100 105 110

20

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
 115 120 125

25

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
 130 135 140

30

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
 145 150 155 160

35

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
 165 170 175

40

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
 180 185 190

45

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

50

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

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

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

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly

	260	265	270
5	Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln 275 280 285		
10	Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly 290 295 300		
15	Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser 305 310 315 320		
20	Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln 325 330 335		
25	Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser 340 345 350		
30	Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn 355 360 365		
35	Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala 370 375 380		
40	Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser 385 390 395 400		
45	Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser 405 410 415		
50	Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val 420 425 430		
	Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu 435 440		
	<210> 34		
	<211> 219		
	<212> PRT		
	<213> Штучна		
	<220>		
	<223> Легкий ланцюг D1.2*		

<400> 34

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

10 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

15 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

20 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

25 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

30 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

35 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

40 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

45 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

50 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

5  
 <210> 35  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

10  
 <220>  
 <223> Важкий ланцюг hC10.2

15  
 <400> 35

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

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

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 25 35 40 45

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

30  
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

35  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 45 115 120 125

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

50  
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

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

370 375 380

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

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

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

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

20 <210> 36  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Штучна

25 <220>  
<223> LC hC10.2

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

30

<210> 37  
<211> 23  
<212> PRT  
35 <213> Штучна

<220>  
<223> Тау-білок 386-408 з фосфорилованими S396 і S404

40 <400> 37

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

45 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu  
20

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

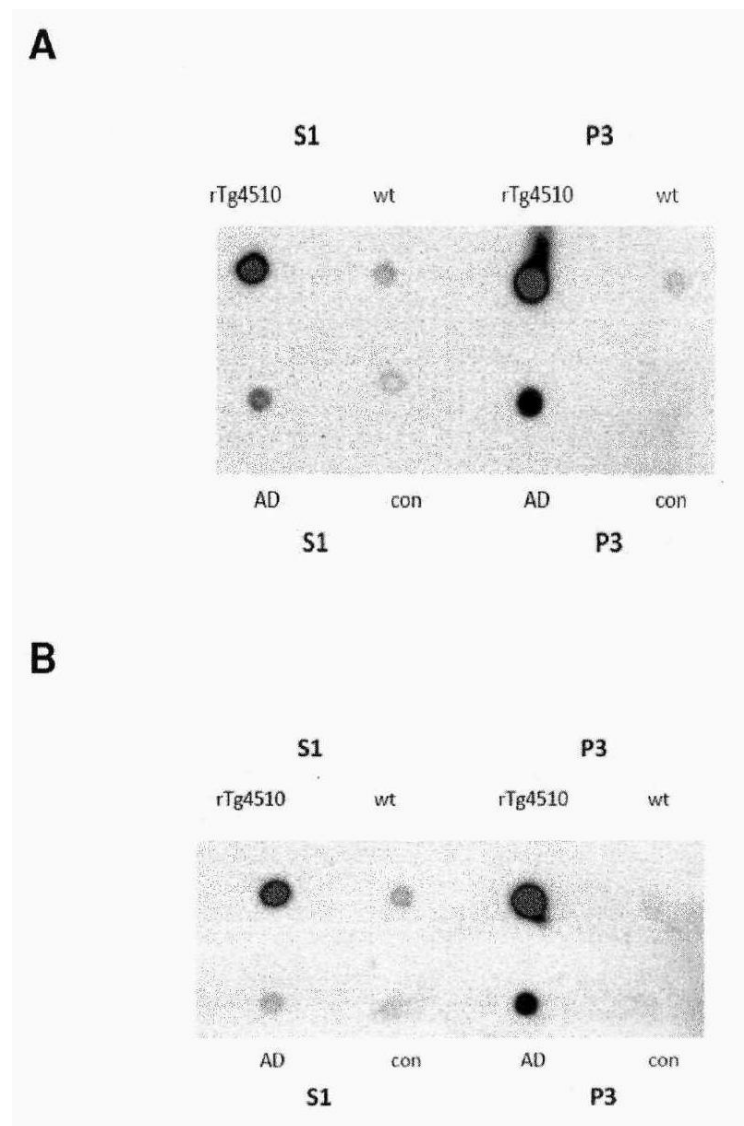
- 50 1. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент, здатні імуноспецифічно зв'язуватися тільки з фосфорилованим залишком 396 людського тау-білка (SEQ ID NO: 33), що містять:
- 55 (a) CDR1 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9;  
(b) CDR2 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10;

(c) CDR3 легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11;  
 (d) CDR1 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12;  
 (e) CDR2 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13;

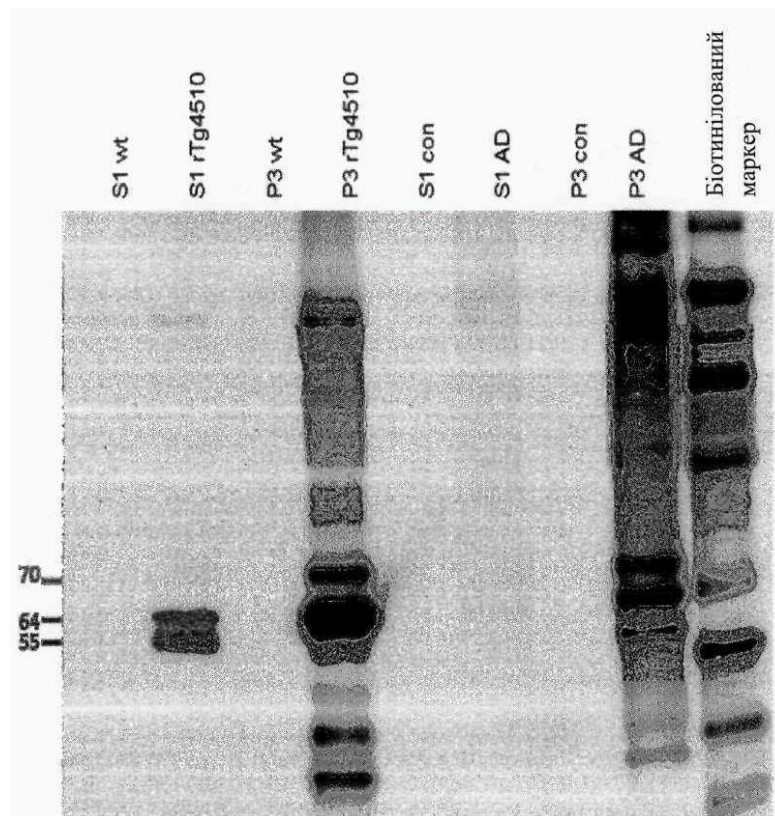
i

- 5 (f) CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14.
2. Моноклональне антитіло за п. 1, що містить важкий ланцюг за SEQ ID NO: 16 і легкий ланцюг за SEQ ID NO: 15.
  3. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2 для застосування в терапії.
  - 10 4. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2 для застосування в лікуванні, діагностиці або візуалізації таупатії.
  5. Моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2 для застосування в лікуванні таупатії, вибраної з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (AD), хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або
  - 15 психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тількими Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD), хвороби Піка, первинної вікової таупатії (PART), сенільної деменції з домінантою нейрофібрилярних клубків, деменції боксерів, хронічної травматичної
  - 20 енцефалопатії, інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона, паркінсонізму, пов'язаного з хромосомою, хвороби Літіко-Бодіга (гуамського комплексу паркінсонізм-деменція), гангліогліоми і гангліоцитоми, менингоангіоматозу, постенцефалітичного паркінсонізму, підгострого склерозуючого паненцефаліту, хвороби Хантінгтона, свинцевої енцефалопатії, туберозного склерозу, хвороби Галлервордена-Шпатца і
  - 25 ліпофусцинозу.
  6. Фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2 та фармацевтично прийнятний носій.
  7. Фармацевтична композиція за п. 6 для застосування в терапії.
  8. Фармацевтична композиція за п. 6 для застосування в лікуванні, діагностиці або візуалізації таупатії.
  - 30 9. Фармацевтична композиція за п. 6 для застосування в лікуванні таупатії, вибраної з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (AD), хвороби аргірофільних зерен (AGD), психозу, зокрема, психозу, обумовленого AD, або психозу у пацієнтів з AD, психіатричних симптомів у пацієнтів з деменцією з тількими Леві, прогресуючого над'ядерного паралічу (PSP), лобно-скроневої деменції (FTD або її варіантів), TBI (травматичного пошкодження головного мозку, гострого або хронічного), кортикобазальної дегенерації (CBD), хвороби Піка, первинної вікової таупатії (PART), сенільної деменції з домінантою нейрофібрилярних клубків, деменції боксерів,
  - 35 хронічної травматичної енцефалопатії, інсульту, відновлення після інсульту, нейродегенерації, пов'язаної з хворобою Паркінсона, паркінсонізму, пов'язаного з хромосомою, хвороби Літіко-Бодіга (гуамського комплексу паркінсонізм-деменція), гангліогліоми і гангліоцитоми, менингоангіоматозу, постенцефалітичного паркінсонізму, підгострого склерозуючого паненцефаліту, хвороби Хантінгтона, свинцевої енцефалопатії, туберозного склерозу, хвороби Галлервордена-Шпатца і ліпофусцинозу.
  - 40 10. Нуклеїнова кислота, яка кодує моноклональне антитіло або його епітопзв'язувальний
  - 45 фрагмент за п. 1 або 2.

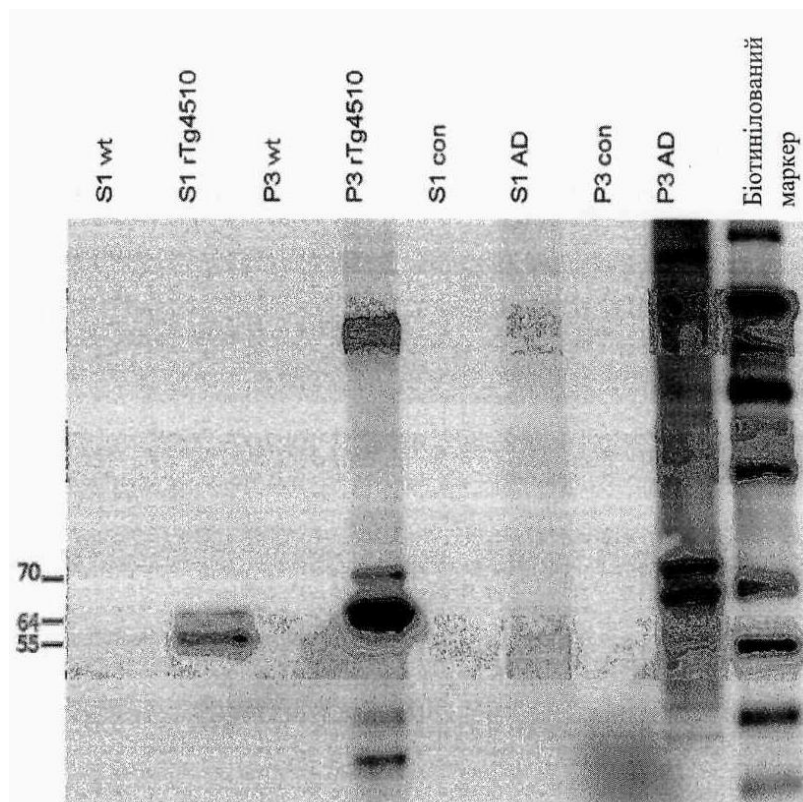




**Fig.1**

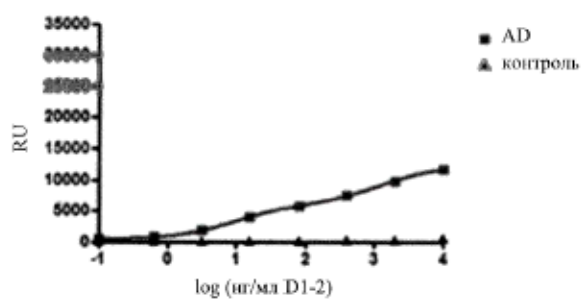


Фіг.2А

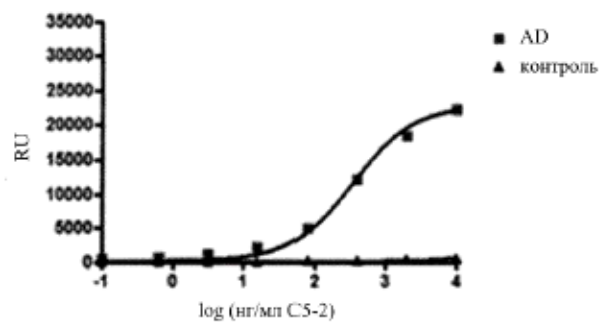


Фіг.2В

A

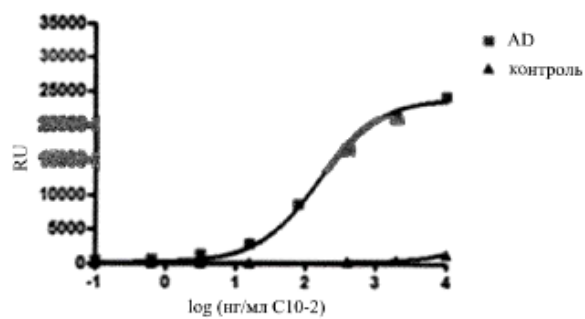


B

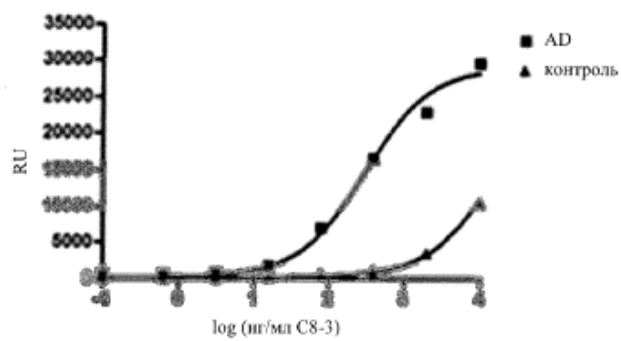


Фіг.3А і 3В

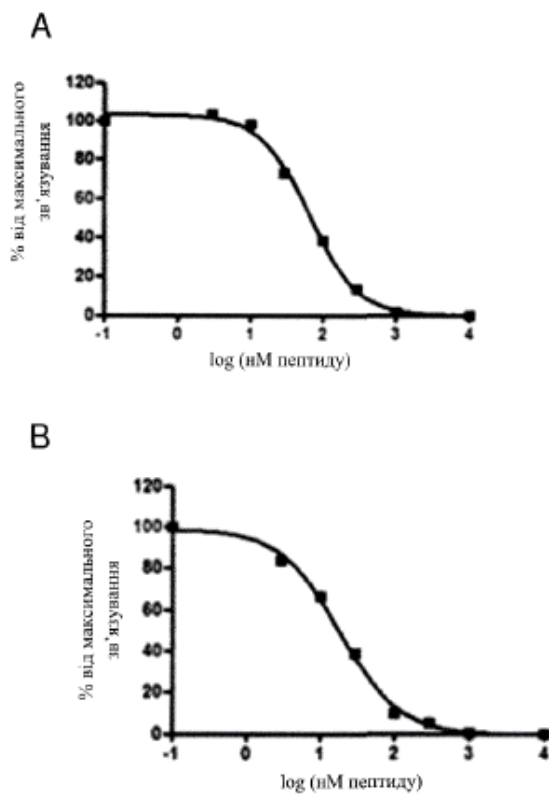
C



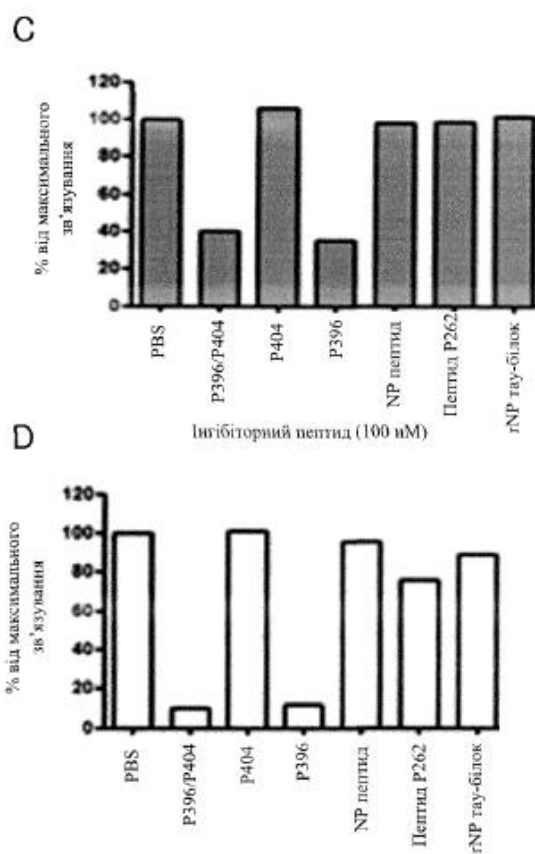
D



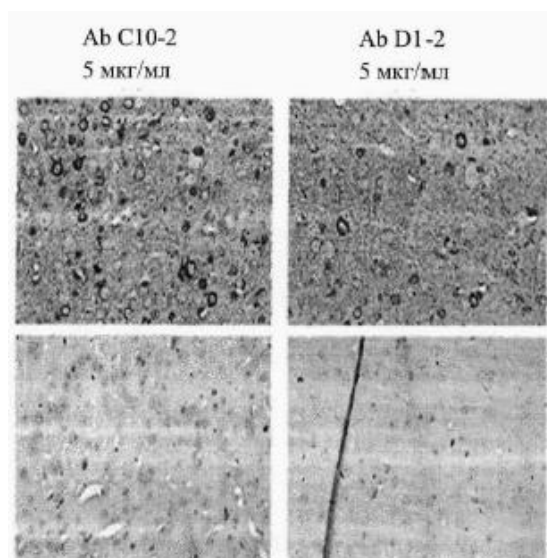
Фіг.3С і 3D



**Фіг.4А і 4В**



**Фіг.4С і 4D**



**Фіг.5А**

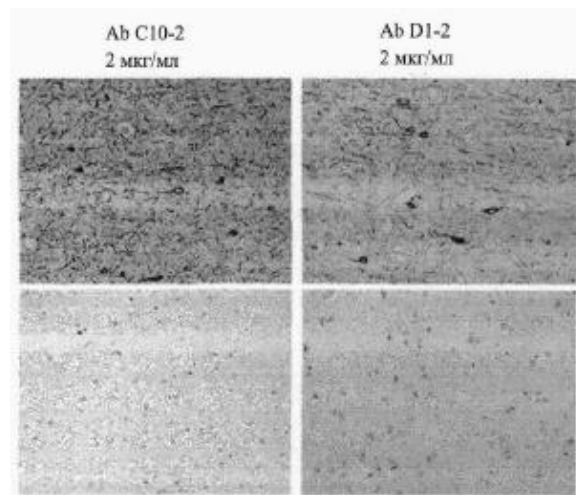


Fig.5B

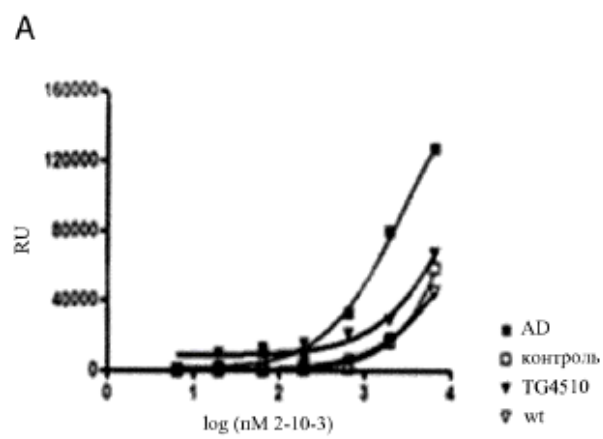


Fig.6A

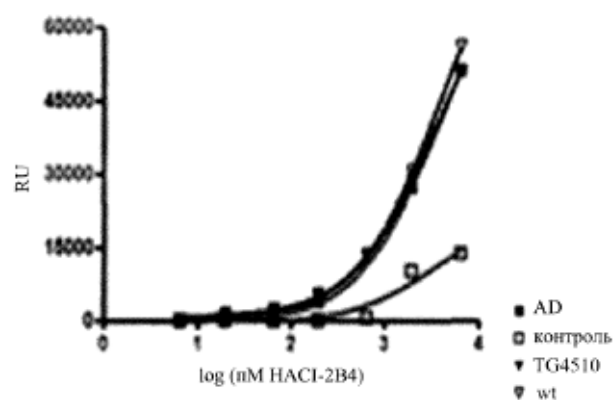
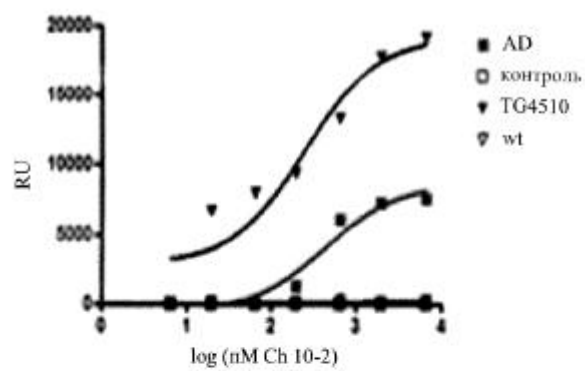
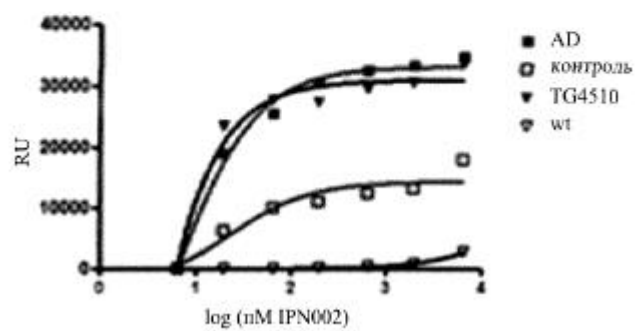


Fig.6B

C

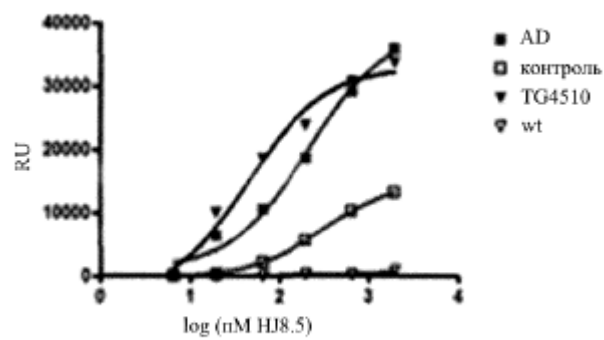


D



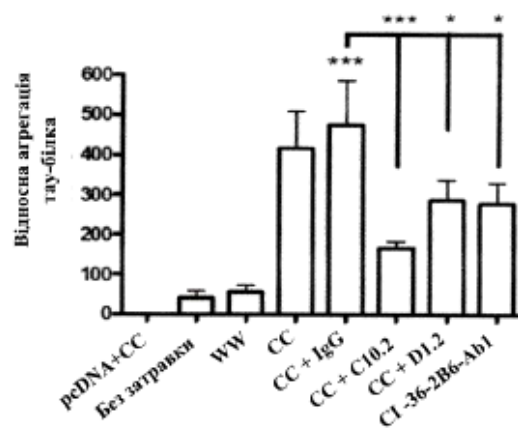
**Фиг.6C i 6D**

E

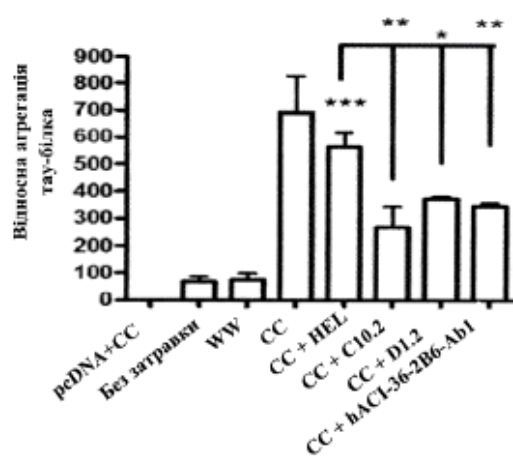


**Фиг.6E**

A

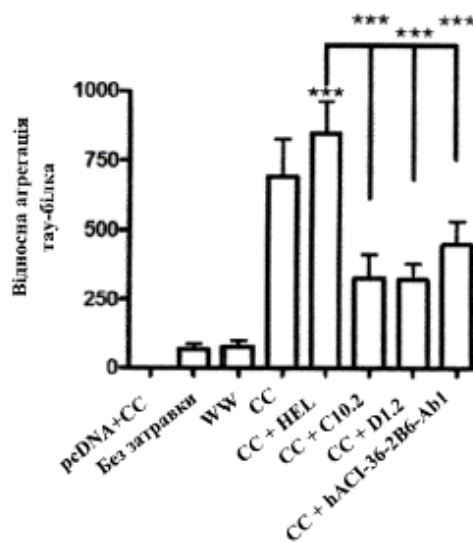


B



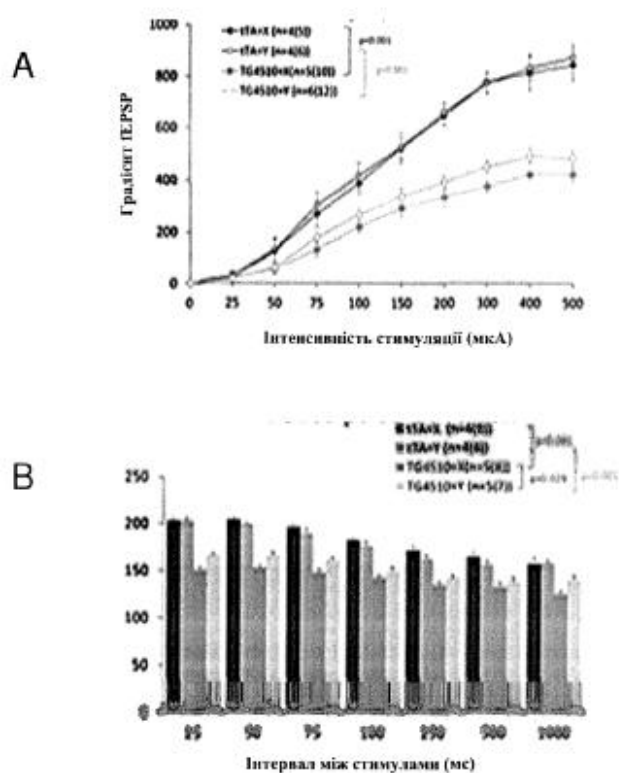
Фіг.7А і 7В

C

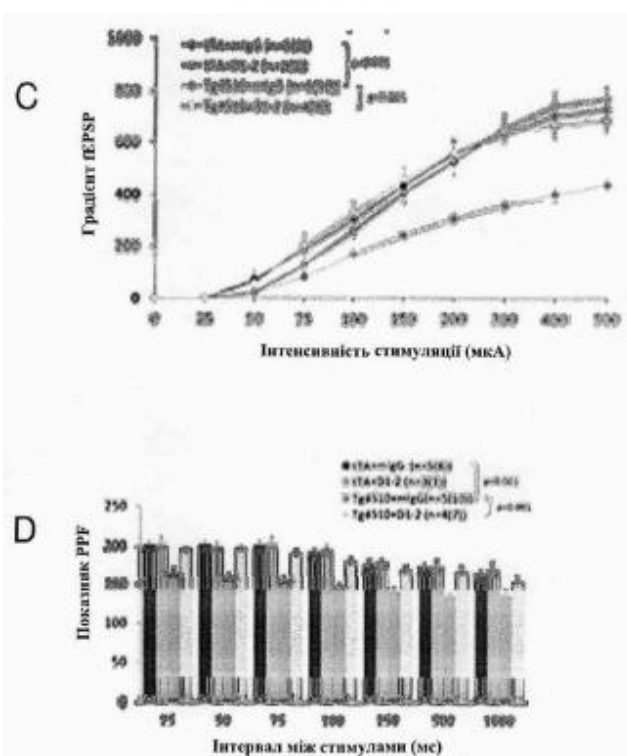


Фіг.7С





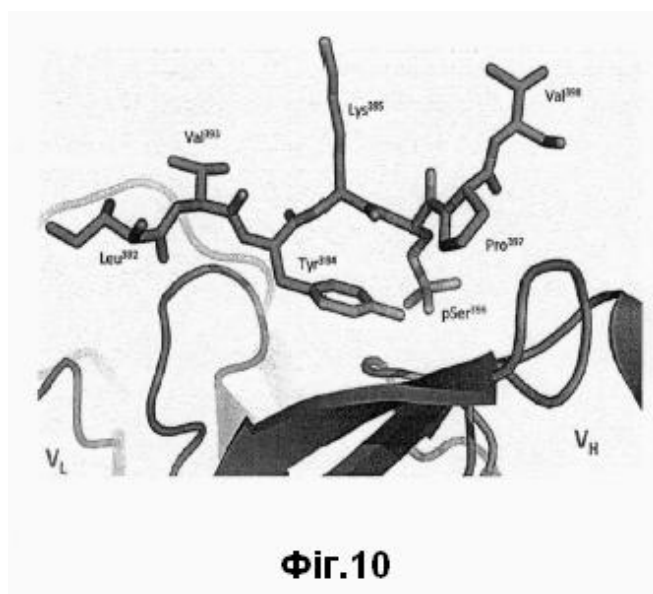
**Фіг.8A і 8B**



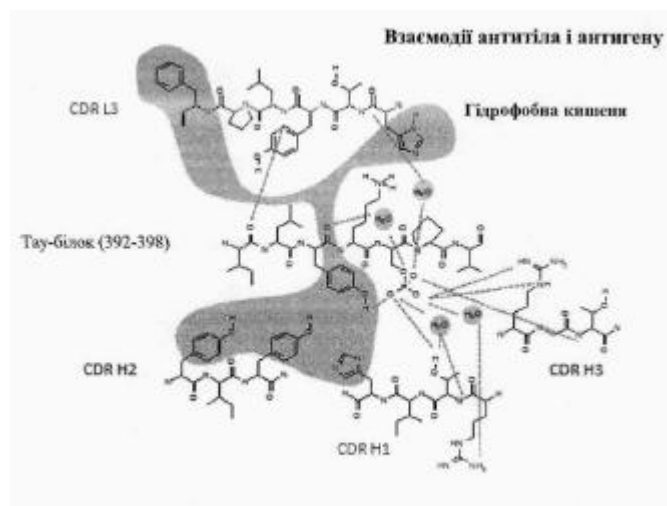
**Фіг.8C і 8D**



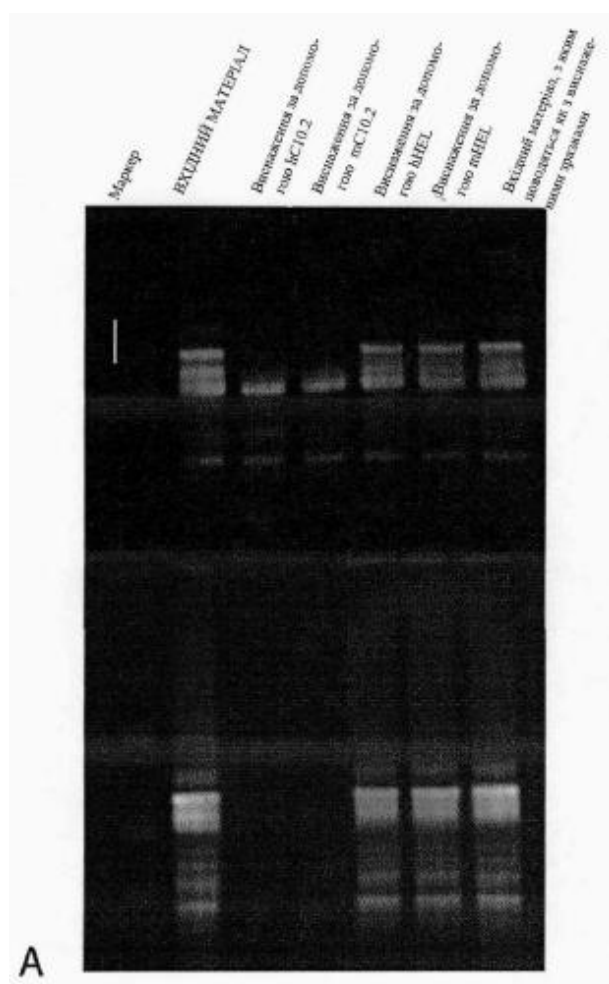
Фіг.9



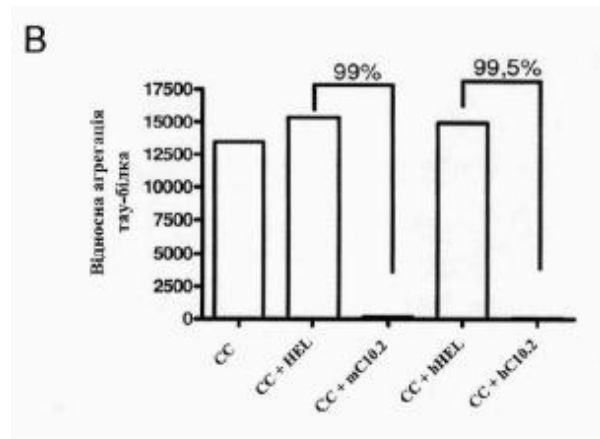
Фіг.10



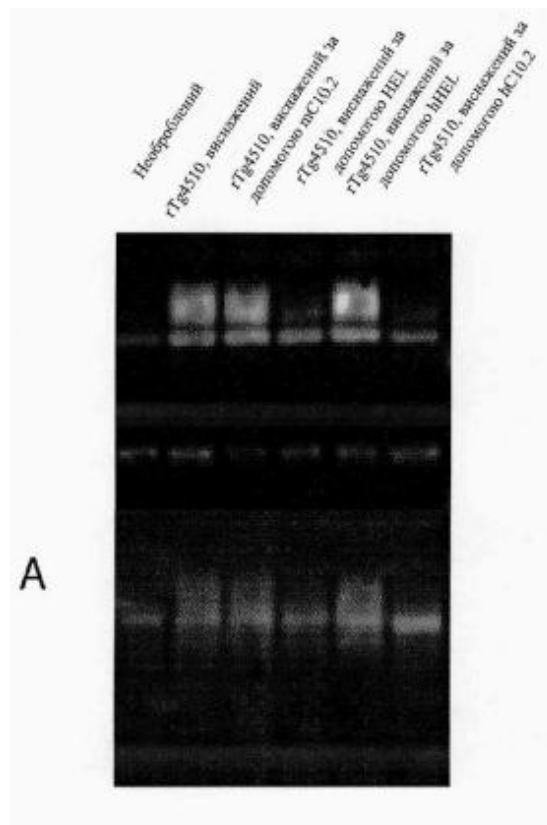
**Fig.11**



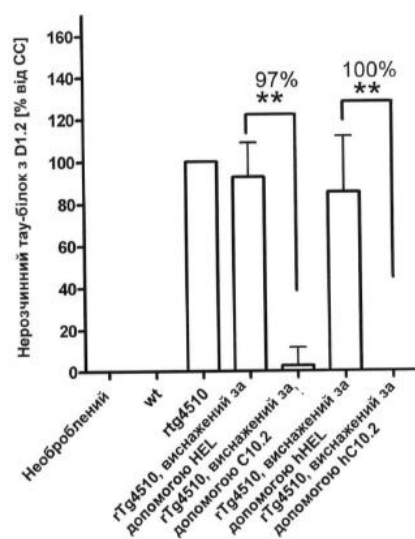
**Fig. 12A**



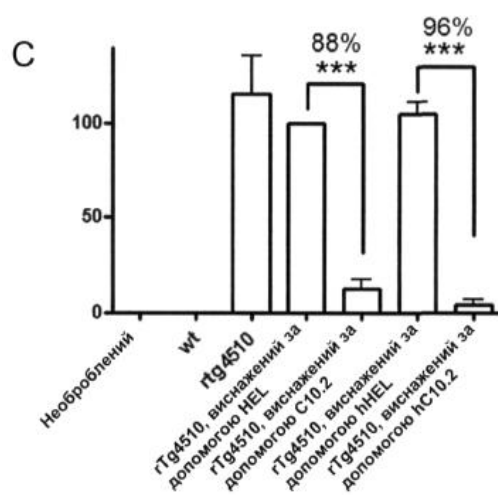
**Фіг.12В**



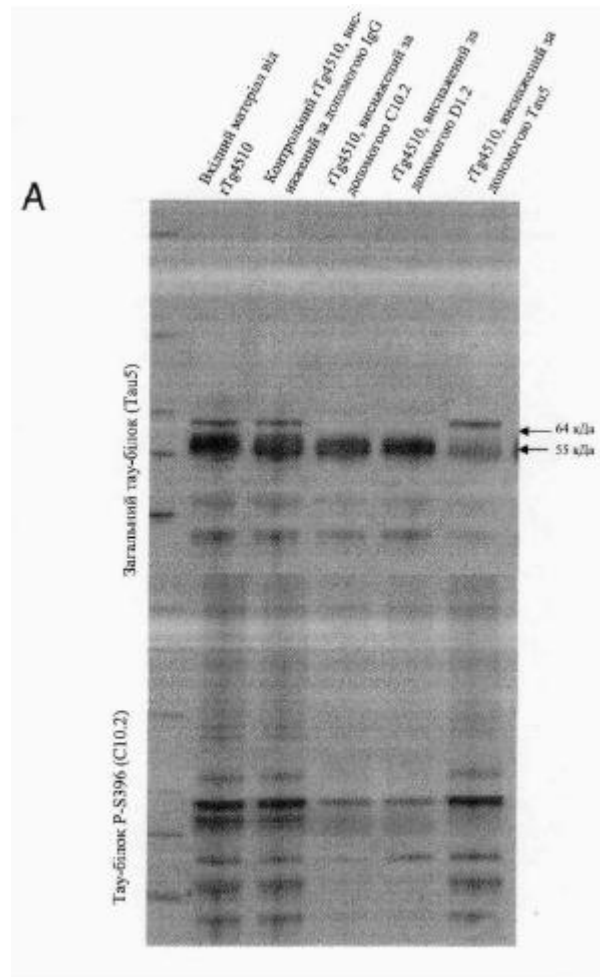
**Фіг.13А**



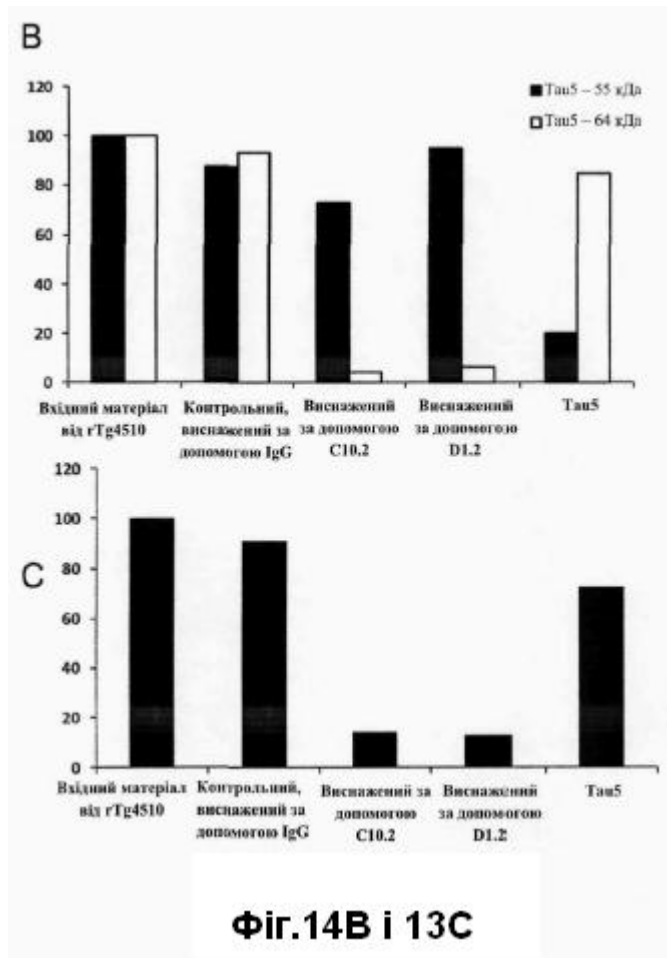
Фіг.13В

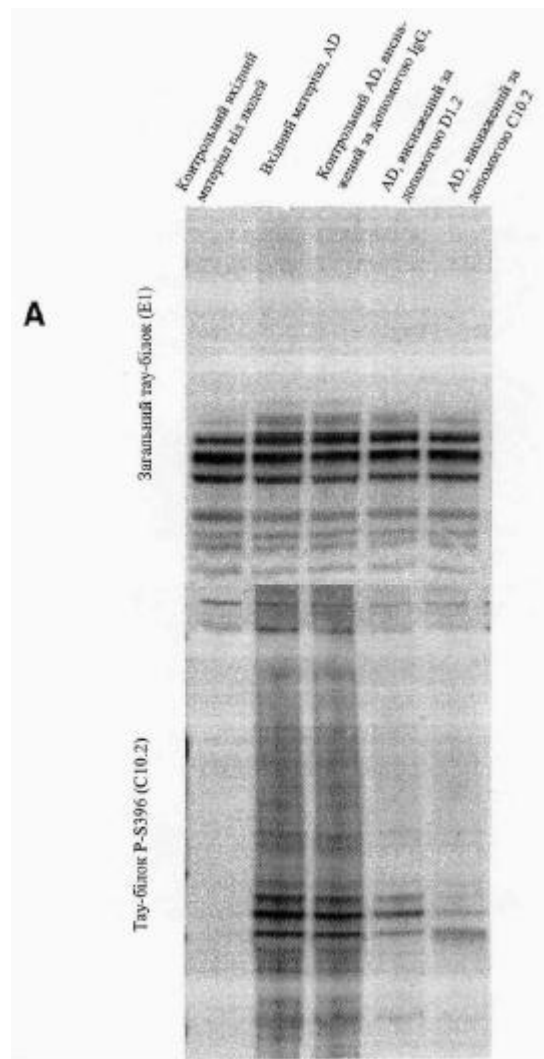


Фіг.13С



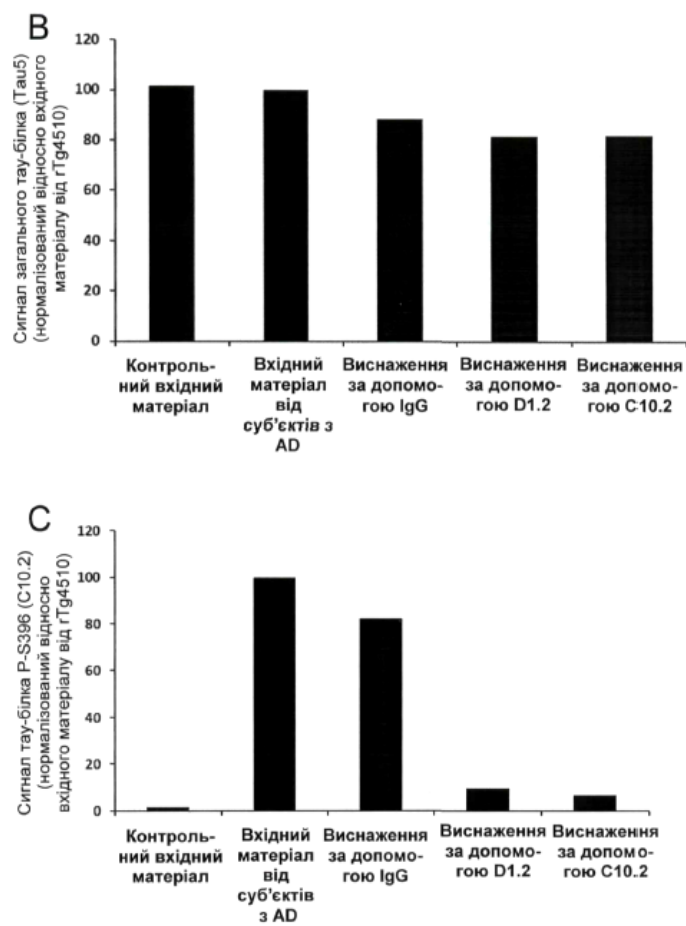
**Фіг.14А**





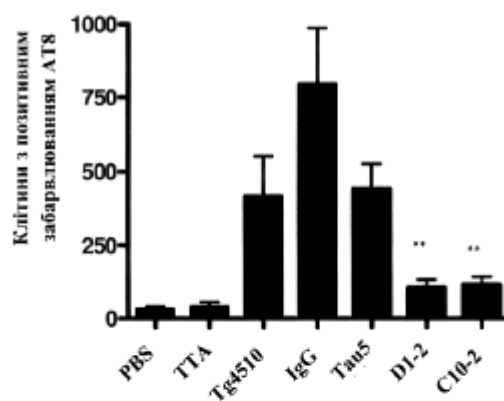
**Фіг.15А**



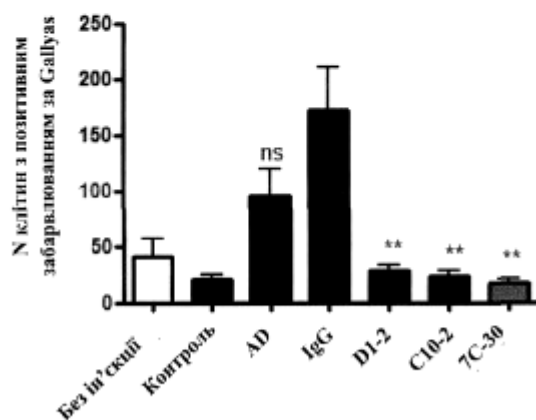


Фіг.15В і 15С

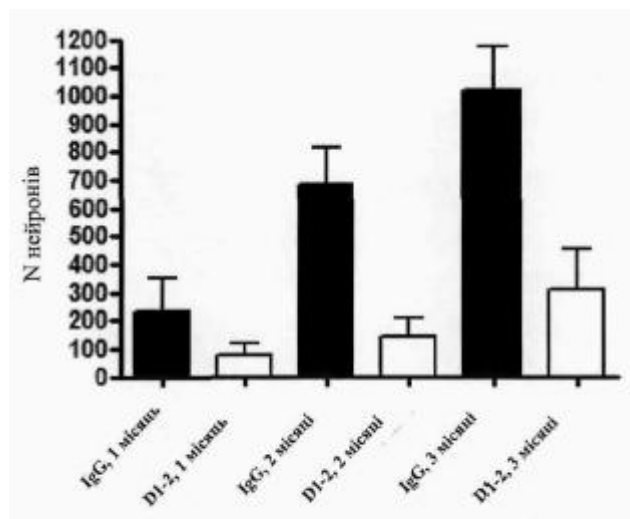
A



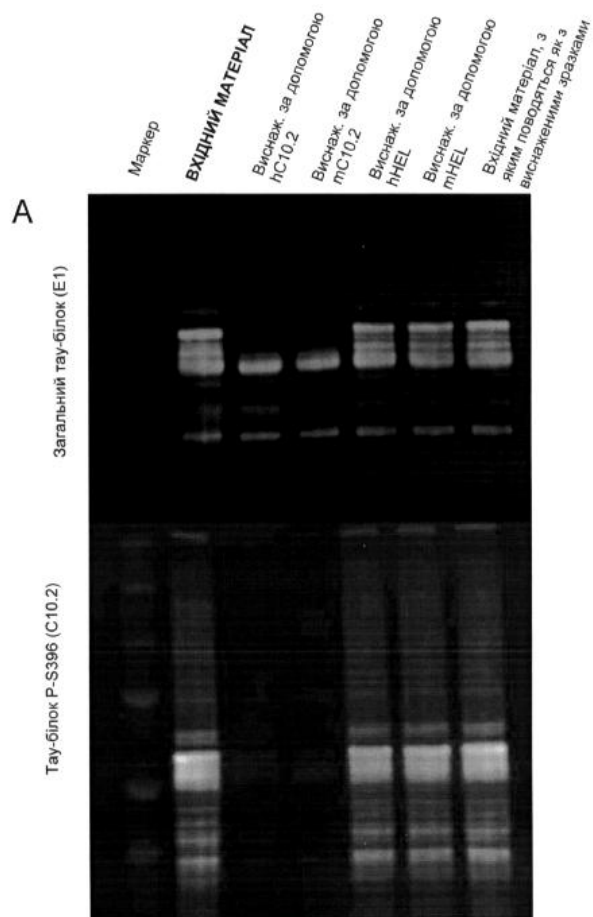
B



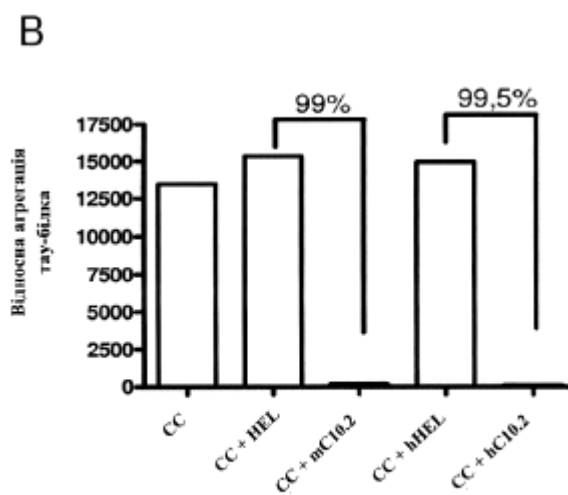
Фіг.16А і 16В



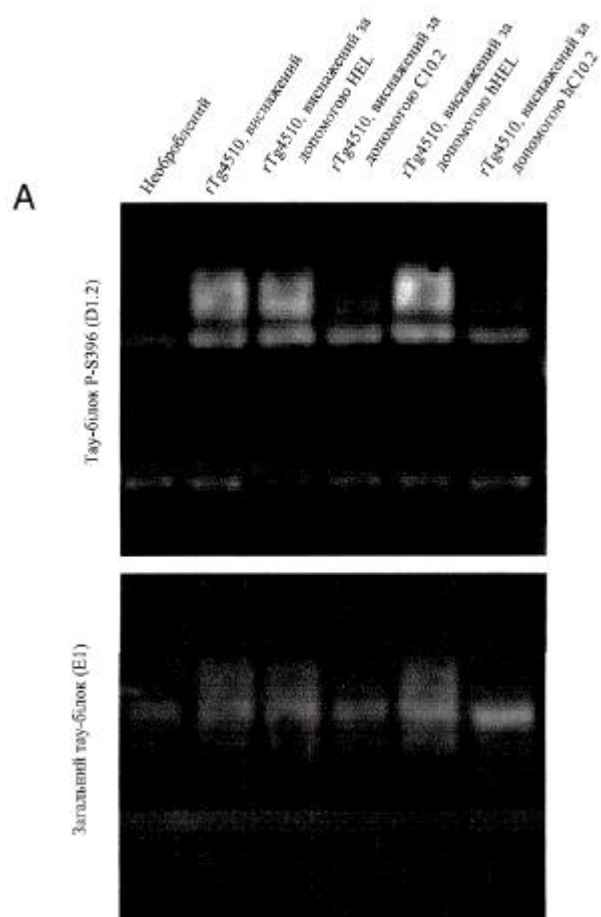
Фіг.17



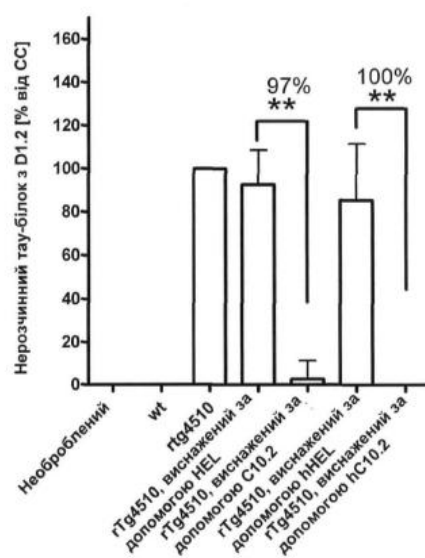
**Фіг.18А**



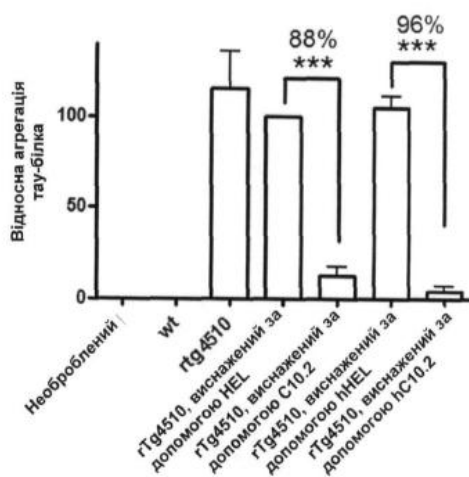
**Фіг.18В**



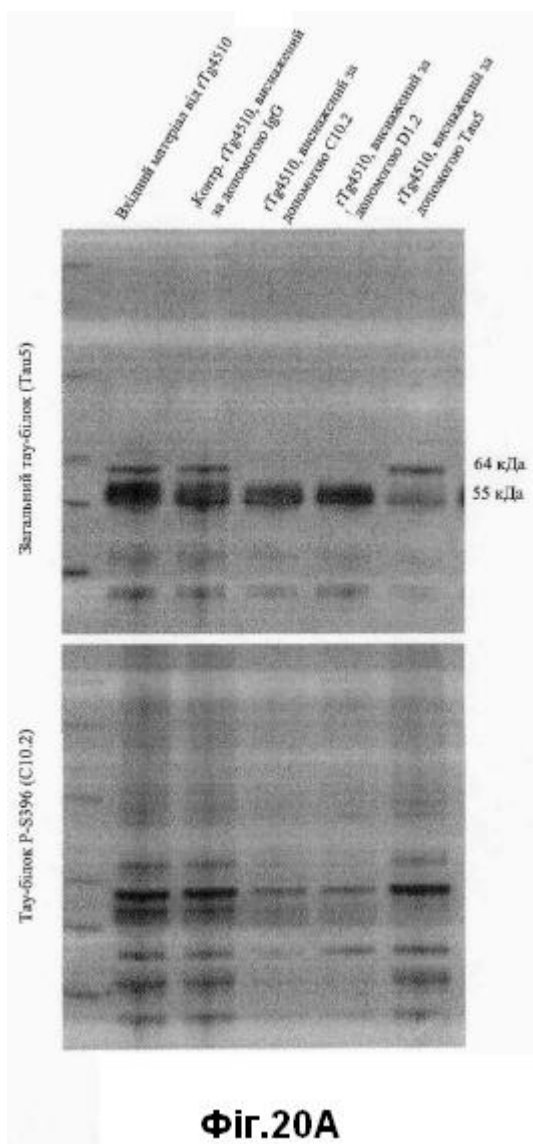
**Фіг.19A**



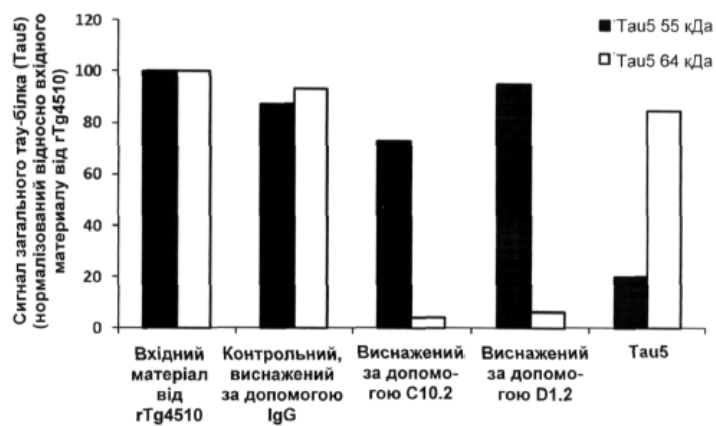
**Фіг.19B**



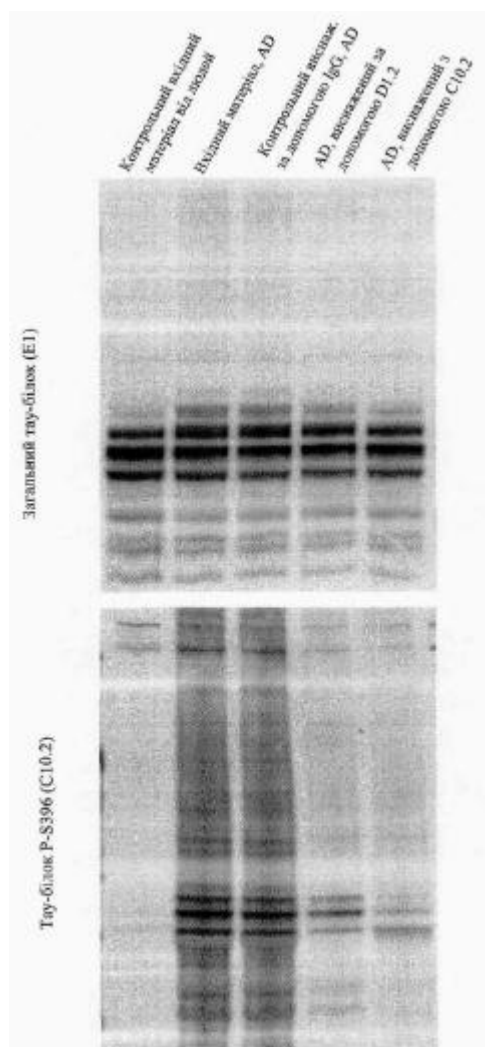
Фіг.19С



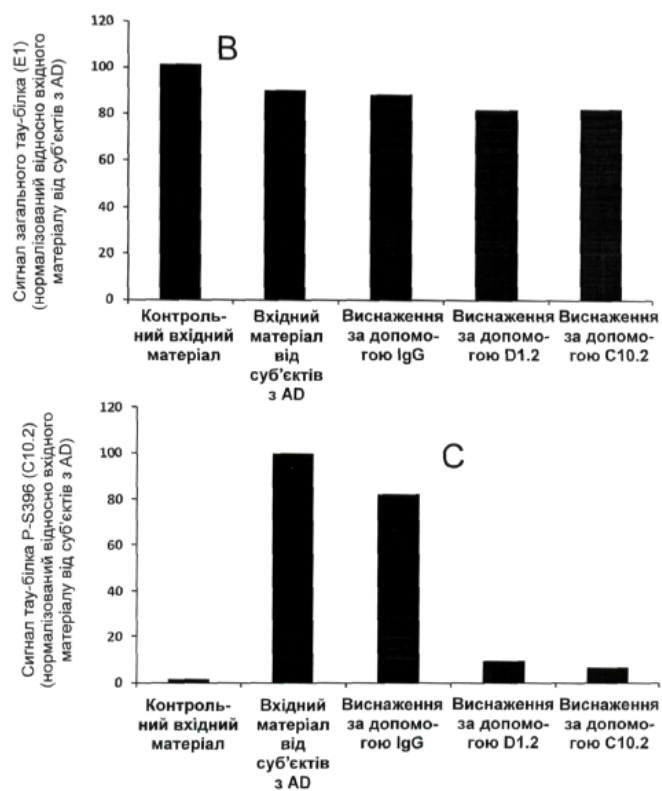
Фіг.20А



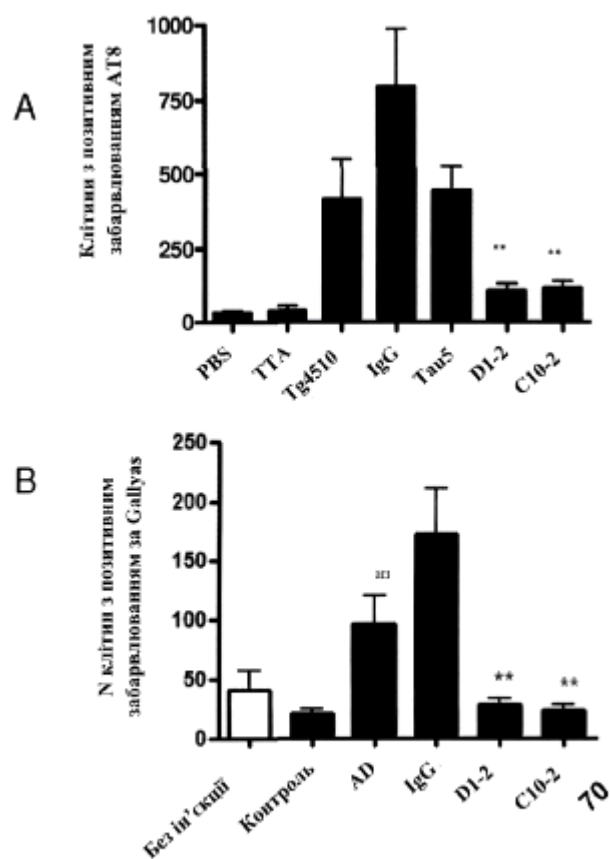
Фіг.20В



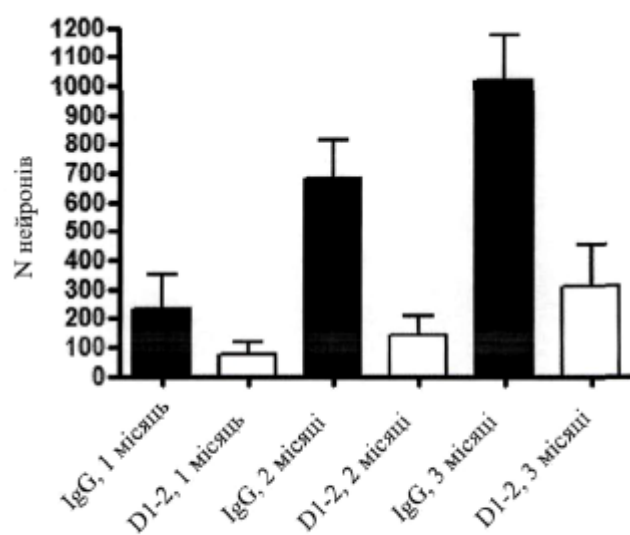
Фіг.21А



Фіг.21В і 21С

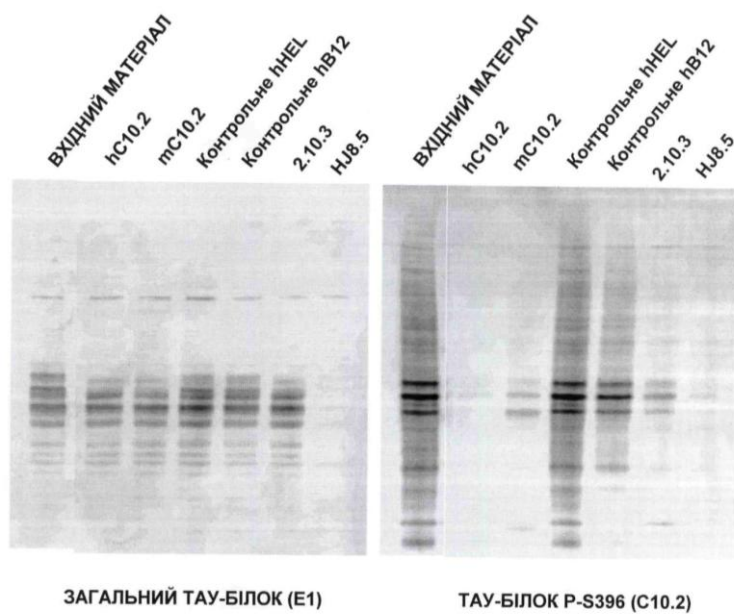


**Фіг.22A і 22B**

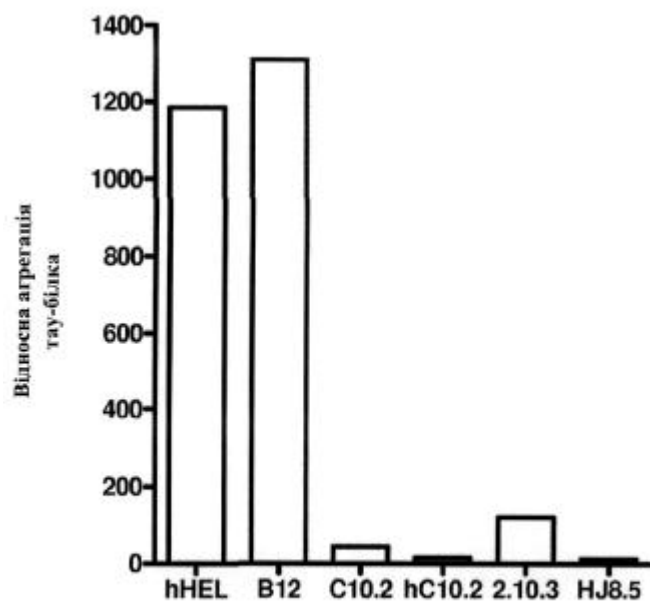


**Фіг.23**

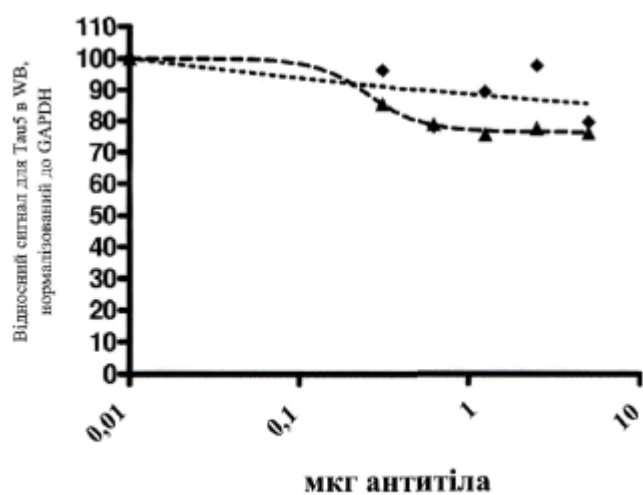




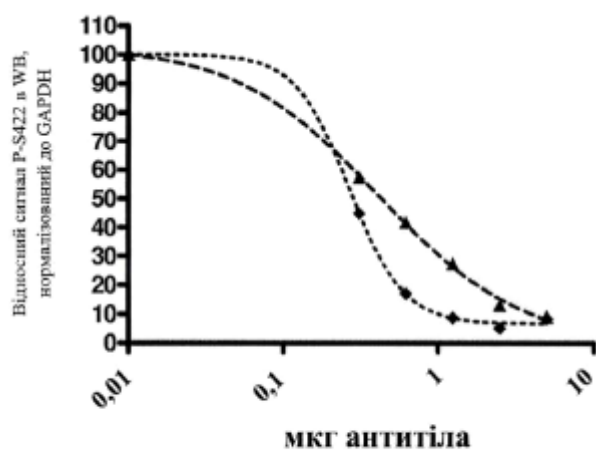
Фіг.24



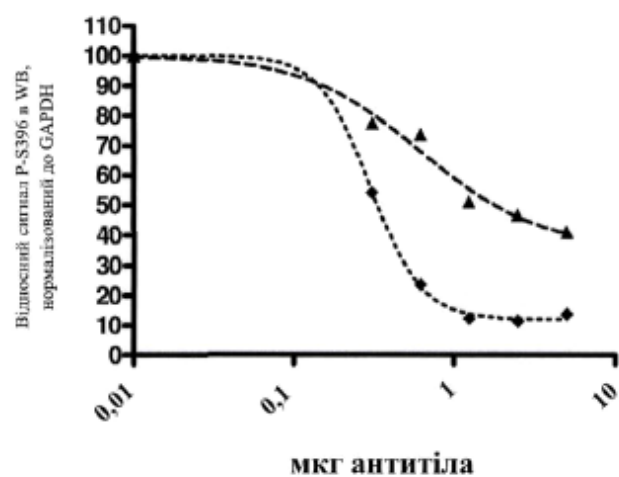
Фіг.25



Фіг.26



Фіг.27



Фіг.28

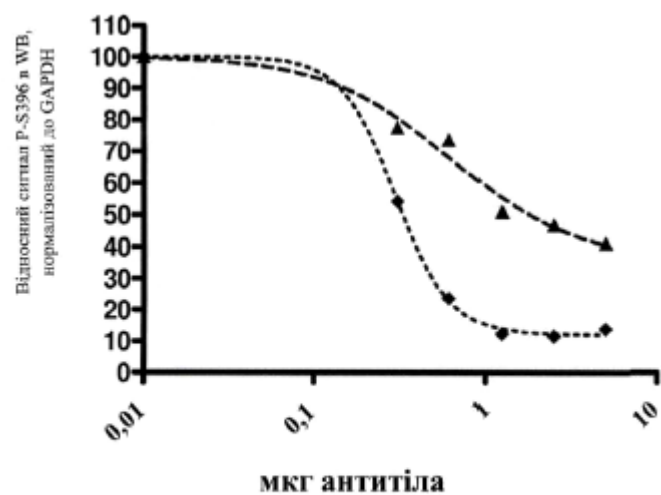


Fig.29

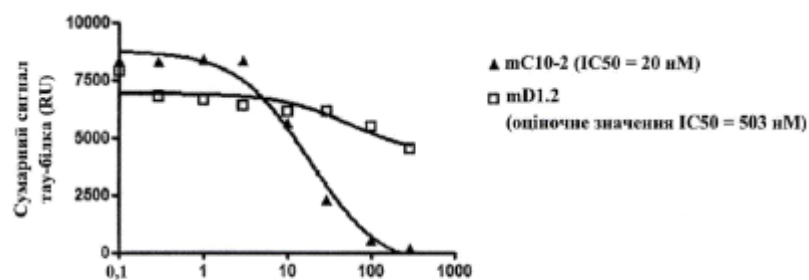


Fig.30

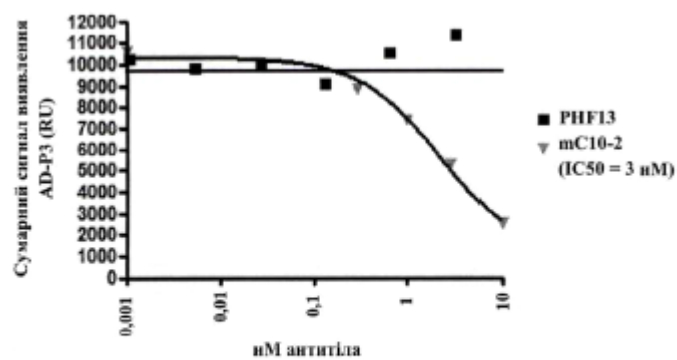
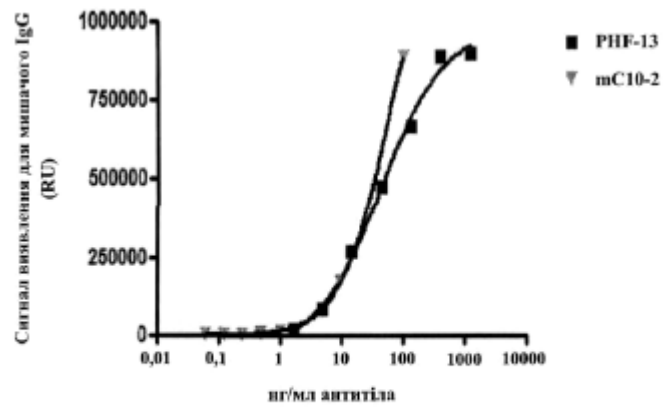
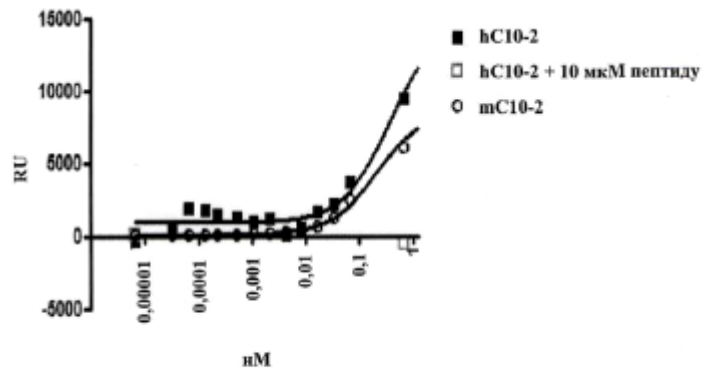


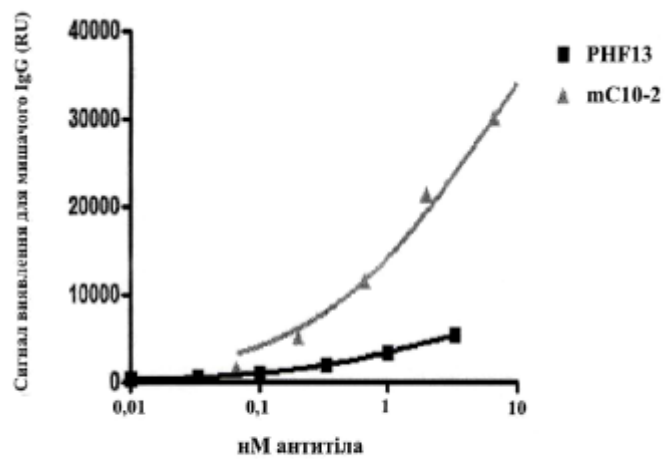
Fig.31



Фіг.32



Фіг.33



Фіг.34