



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114902** (13) **C2**  
(51) МПК**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)  
**G01N 33/531** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2014 08042**

(22) Дата подання заявки: **19.12.2012**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **28.08.2017**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/577,817**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.12.2011**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **27.10.2014, Бюл.№ 20**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **28.08.2017, Бюл.№ 16**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/US2012/070486, 19.12.2012**

(72) Винахідник(и):  
**Олдерфер Крістофер (US),  
Жанеккі Даріуш (DK),  
Лу Сюесун (US),  
Мердок Мелісса (US),  
Ву Шен-Дзюн (US),  
Меркен Марк (BE),  
Вандермерен Марк (BE),  
Маліа Томас (US)**

(73) Власник(и):  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК.,  
800/850 Ridgeview Drive, Horsham,  
Pennsylvania 19044, United States of America (US)**

(74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 9308302 A1, 29.04.1993  
WO 9517429 A1, 29.06.1995  
WO 9604309 A1, 15.02.1996  
WO 2010144711 A2, 16.12.2010  
US 2011059093 A1, 10.03.2011  
Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein / Porzig R., Singer D., Hoffmann R. // Biochemical and biophysical research communications, Academic press INC. Orlando, FL. - US. - 2007. - Vol. 358. - no. 2. - P. 644 - 649  
Neighbored phosphorylation sites as PHF-tau specific markers in Alzheimer's disease / Singer D., Lehmann J., Hanisch K. et al. // Biochemical and biophysical research communications, Academic press INC. Orlando, FL. - US. - Vol. 346. - no. 3. - P. 819 - 828  
A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease / Jicha G. A., Leane E., Vincent I. et al. // Journal of neurochemistry. - 1997. - Vol. 69. - no. 5. - P. 2087 - 2095  
Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites / Hoffmann R., Lee V. M.-Y., Leight S. et al. // Biochemistry, American chemical society, US. - 1997. - Vol. 36. - no. 26. - P. 8114 - 8124  
Characterization of mab ap422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein / Hasegawa M., Jakes R., Crowther R.A. // Febs letters, Elsevier, Amsterdam, NL. - 1996. - Vol. 384. - P. 25 - 30

UA 114902 C2

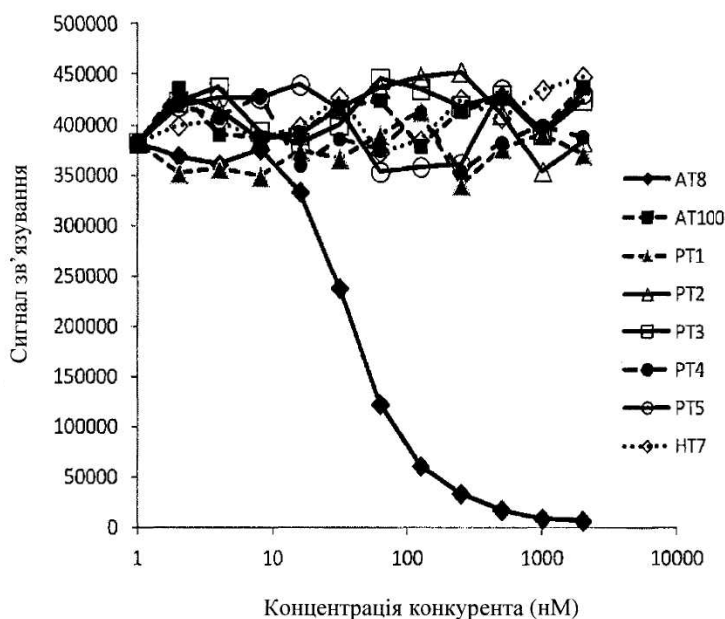
- (56) New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human paired helical filament tau proteins / Condamines O., Buée-Scherrer V., Boissier L. et al. // Neuroscience letters, Limerick. - IE. - 1995. - Vol. 192. - no. 2. - P. 81 - 84
- Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein / Goedert M., Jakes R., Crowther R. A. et al. // Biochemical journal, Portland press LTD. - GB. - 1994. - Vol. 301. - no. PART 03. - P. 871 - 877
- Characterization of two distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments: further evidence for fetal-type phosphorylation of the  $\tau$  in paired helical filaments / Masato H., Atsushi W., Koji T. et al. // Journal of neurochemistry. - New York. - US. - 1993. - Vol. 60. - no. 6. - P. 2068 - 2077
- Neurofilament monoclonal antibodies RT97 and 8D8 recognize different modified epitopes in paired helical filament- $\tau$  in Alzheimer's disease / J.-P. Brion, A.-M. Couck, J. Robertson et al. // Journal of neurochemistry, New York, US. - 1993. - Vol. 60. - no. 4. - P. 1372 - 1382

**(54) ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ ПАРНИЙ СПІРАЛЬНИЙ ФІЛАМЕНТ-ТАУ (ПСФ-ТАУ), ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ТАКЕ АНТИТІЛО**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується виділеного антитіла, яке зв'язує парний спіральний філамент-тау (ПСФ-тау), вектора, клітини-хазяїна, способу одержання такого антитіла та фармацевтичної композиції для зменшення агрегації тау в парних спіральних філаментах (ПСФ-тау), що його містить.

Конкуренція міченого AT8 і різних мкАТ



Фиг. 1

Ця заявка просить переваги попередньої заявки на патент США номер 61/577817, поданої 20 грудня 2011 р., зміст якої повністю включений у даний документ шляхом посилання.

#### ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується анти-ПСФ-тау-антитіл і способів їх отримання й застосування.

#### 5 ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Хвороба Альцгеймера (БА) являє собою дегенеративне порушення мозкової діяльності, яке характеризується в клінічному аспекті прогресуючою втратою пам'яті, когнітивних функцій, логічного мислення, здорового глузду й емоційної стійкості, що поступово призводить до глибокого психічного розпаду й, зрештою, до смерті. БА часто є причиною прогресуючого слабоумства (деменції) у літніх людей, це захворювання вважається четвертою за поширеністю причиною смерті від захворювань у США. БА спостерігається в різних етнічних групах по всьому світі й являє собою основну проблему громадського здоров'я сьогодні й у майбутньому.

Для головного мозку людини, що страждає на БА, характерно ураження, що називається сенільними (або амілоїдними) бляшками, амілоїдною ангіопатією (амілоїдними відкладеннями в кровоносних судинах) і нейрофібрилярними клубками. Велика кількість таких осередків ураження, зокрема амілоїдних бляшок і нейрофібрилярних клубків парних спіральних філаментів, загалом виявляються в пацієнтів із БА в декількох ділянках головного мозку, що відповідають за пам'ять і когнітивну функцію.

Основним білковим компонентом нейрофібрилярної дегенерації при БА й деяких інших нейродегенеративних захворюваннях є гіперфосфорилована форма асоційованого з мікротрубочками тау-білка. Розробки лікарських препаратів, які запобігають або усувають агрегацію тау-білків, викликають велику зацікавленість упродовж багатьох років, однак потенційні препарати, включаючи протиагрегаційні сполуки й інгібітори кіназ, тільки допущені на стадію клінічних досліджень (Brunden, et al. "Nat Rev Drug Discov" 8:783-93, 2009).

Не так давно отримані дані доклінічних досліджень на трансгенній мишачій моделі тау-патології, які свідчать, що активна й пасивна імунізація проти тау може мати терапевтичну дію (Chai, et al. "J Biol Chem" 286:34457-67, 2011, Boutajangout, et al. "J Neurochem" 118:658-67, 2011, Boutajangout, et al. "J Neurosci" 30:16559-66, 2010, Asuni, et al. "J Neurosci" 27:9115-29, 2007). Не так давно описана гіпотеза про передачу й розповсюдження таупатії, яка основана на стадіях прогресування таупатії за Braak у головному мозку людини й поширенні таупатії на доклінічних моделях таупатії після введення агрегатів тау-білка. (Frost, et al. "J Biol Chem" 284:12845-52, 2009, Clavaguera, et al. "Nat Cell Biol" 11:909-13, 2009). Таким чином, існує потреба в лікарських препаратах для запобігання агрегації тау-білків і прогресуванню таупатії для лікування БА та інших нейродегенеративних захворювань.

#### 35 КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На фігурі 1 показана конкуренція міченого AT8 різними анти-тау антитілами.

На фігурі 2 показана конкуренція міченого PT1 і різних анти-тау антитіл.

На фігурі 3 показана конкуренція міченого PT3 і різних анти-тау антитіл.

На фігурі 4 показана конкуренція міченого AT100 і різних анти-тау антитіл.

40 На фігурі 5 показана конкуренція міченого HT7 і різних анти-тау антитіл.

Фігура 6 (А) Аналіз фосфорилизованого тау в гомогенатах стовбура головного мозку (фракція Р1), отриманих від 5-місячних самиць трансгенних тварин із мутантним тау Р301L, яким вводили сольовий розчин, мишей із IgG1, PT3 або AT8, як указано на фігурі, або від інтактних нетрансгенних тварин (В6). Проводили ІФА з використанням AT8 (ліве поле) або AT100 (праве поле) як іммобілізуючих антитіл із подальшим використанням біотинільованого-HT7 і авідину, кон'югованого з пероксидазою хрину. Сигнали ІФА відбивалися на графіку як відносна кількість гомогенату головного мозку тварин із БА (нг/мл), що забезпечує той самий сигнал ІФА, що й проб, отриманих від нетрансгенних тварин (В6). Дані показані на графіку індивідуально з середнім  $\pm$  С.О. Вказані значення р відмінностей між тваринами, яким вводили PT3 і IgG1. (В) Вестерн-блотинг фракції Р1 гомогенатів стовбура головного мозку, отриманих від тварин, яким вводили IgG1 або PT3 із використанням AT100. Показані сигнали від гомогенатів, отриманих від 10 тварин, яким вводили IgG1 (від IgG1-1 до IgG1-10), і 7 тварин, яким вводили PT3 (PT3-1, PT3-2, від PT3-7 до PT3-10). Як контроль завантаження використовували актин.

Фігура 7 Рівні загального тау в саркозил-розчинній (рТ4-розчинній) фракції, загального тау нерозчинної (рТ4-нерозчинної) фракції й фосфорилизованого тау в нерозчинній (AT8-нерозчинній) фракції гомогенатів кори головного мозку, отриманих від 5-місячних самиць трансгенних мишей із мутантним тау Р301L, яким вводили PT3 або ізотип (IgG) як контроль, як указано на фігурі. Рівні показані як міра сили сигналу, отриманого під час ІФА, зображеного графічно індивідуально із середнім  $\pm$  С.О. Проба 1m inj являє собою пробу позитивного контролю, отриману з головного мозку миші з мутантним тау Р301L, якій вводили агрегат тау.

#### 60 ВИКЛАД СУТІ ВІНАХОДУ

Один аспект винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 або 37, й антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:36 або 38.

Інший аспект винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить деякі ділянки важкого ланцюга й легкого ланцюга, які визначають комплементарність.

Ще один аспект винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальні ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 і антигензв'язувальні ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 36.

Інший аспект винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:37 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 38.

Інший аспект винаходу являє собою виділене антитіло або фрагмент, який конкурує за зв'язування ПСФ-тау з моноклональним антитілом, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 35 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 36, або антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 37 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 38.

Інший аспект винаходу являє собою полінуклеотиди, які кодують антитіла або фрагменти, що розкриваються в даному винаході.

Інший аспект винаходу являє собою вектор, який містить полінуклеотид, що розкривається в даному винаході.

Інший аспект винаходу являє собою клітину-хазяїна, яка містить вектор, що розкривається в даному винаході.

Інший аспект винаходу являє собою спосіб отримання антитіла, здатного зв'язувати ПСФ-тау, що містить культивування клітин-хазяїнів, що розкриваються в даному винаході, і витягуванні антитіл, які продукуються клітиною-хазяїном.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Використовуваний у даному винаході термін "антитіла" має широке значення й включає імуноглобуліни або молекули антитіл, включаючи поліклональні антитіла, моноклональні антитіла (зокрема, мишачі, людські, адаптовані до людини, гуманізовані й химерні моноклональні антитіла й фрагменти антитіл).

У загальному значенні антитіла є білками або пептидними ланцюжками, які специфічно зв'язуються зі специфічним антигеном. Структури антитіл добре відомі. Імуноглобуліни можна розділити на п'ять основних класів, а саме: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, залежно від амінокислотної послідовності константного домену важкого ланцюга. IgA і IgG далі поділяються на ізотипи IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Виходячи з амінокислотної послідовності константних доменів, легкий ланцюг антитіла будь-якого виду хребетний може бути віднесений до одного з двох типів, що чітко розрізняються, а саме: каппа (κ) і лямбда (λ).

Термін "фрагмент антитіла" означає частину інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають у себе фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv, CDR, антигензв'язувальну ділянку, варіабельну ділянку важкого або легкого ланцюга, діатіла, молекули одноланцюгових антитіл і поліспецифічні антитіла, утворені щонайменше з двох інтактних антитіл або їх фрагментів.

Варіабельні ділянки легкого або важкого ланцюга імуноглобулінів складаються з "каркасної" ділянки, перерваної трьома "антигензв'язувальними ділянками". Антигензв'язувальні ділянки можуть описуватися різними термінами, наприклад: (I) Ділянки (CDR), які визначають комплементарність, ґрунуються на варіабельності послідовності (Wu and Kabat "J Exp Med" 132:211-50, 1970). Загалом, антигензв'язувальна ділянка має три CDR у кожній варіабельній ділянці (HCDR1, HCDR2 і HCDR3 у варіабельній ділянці важкого ланцюга (VH) і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 у варіабельній ділянці легкого ланцюга (VL)) (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (II) Термін "гіперваріабельна ділянка", "HVR" або "HV" стосується ділянок варіабельного домену антитіла, які мають гіперваріабельну структуру, як визначено Chothia і Lesk (Chothia and Lesk "J Mol Biol" 196:901-17, 1987). Загалом, антигензв'язувальна ділянка має три гіперваріабельні ділянки в кожній VH (H1, H2, H3) і VL (L1, L2, L3). Chothia і Lesk називають структурно стабілізовані HV "канонічними структурами". Номенклатури, а також анотації CDR і HV не так давно переглядалися Abhinandan і Martin (Abhinandan and Martin "Mol Immunol" 45:3832-9, 2008). (III) Інше визначення ділянок, які утворюють антигензв'язувальну ділянку, запропоновано Lefranc (Lefranc, et al. "Dev Comp Immunol" 27:55-77, 2003) на основі порівняння V-доменів із імуноглобулінів і Т-клітинних рецепторів. У міжнародній базі даних ImMunoGeneTics (IMGT; <http://www.imgt.org>) наводиться стандартизована нумерація і дефініція цих ділянок.

Відповідність між CDR, HV і IMGT детально описана в Lefranc et al., вище. (IV) Антигензв'язувальна ділянка також визначається на основі використання залишків (SDRU), які визначають специфічність (Almagro "J Mol Recognit" 17:132-43, 2004), де залишки (SDR), які визначають специфічність, означають залишки амінокислоти імуноглобуліну, які безпосередньо залучені до контакту з антигеном.

"Каркас" або "каркасна послідовність" являють собою послідовності, що залишилися у варіабельній ділянці антитіла, окрім тих, які визначаються як послідовності антигензв'язувальної ділянки. У зв'язку з тим, що точне визначення антигензв'язувальної ділянки може бути позначено різними дефініціями, як описано вище, точна каркасна послідовність залежить від визначення антигензв'язувальної ділянки.

Використовуваний у цьому документі термін "моноклональне антитіло" (мкАТ) означає антитіло (або фрагмент антитіла), отримане з популяції по суті гомогенних антитіл. Моноклональні антитіла високоспецифічні і, як правило, спрямовані проти єдиної антигенної детермінанти.

Використовуваний у цьому документі термін "епітоп" означає частину антигену, з якою специфічно зв'язуються антитіла. Епітопи зазвичай складаються з хімічно активних (таких як полярних, неполярних або гідрофобних), поверхнево розташованих функціональних груп, таких як амінокислоти або бокові ланцюги фосфорилованих амінокислот, і можуть мати специфічну тривимірну структуру, а також специфічний заряд. Будова епітопу може бути лінійною або переривчастою, наприклад, конформаційний епітоп, який формується внаслідок просторової взаємодії між несуміжними ділянками амінокислот антигену, на відміну від взаємодії лінійних послідовностей амінокислот. Конформаційний епітоп включає епітопи, які виникають внаслідок просторового згортання білків антигенів, під час якого амінокислоти з різних ділянок лінійної послідовності антигену виявляються в тісній близькості в тривимірному просторі.

Тау являє собою білок, широко поширений у центральній і периферичній нервовій системі, що має множинну широко відомих ізоформ. У ЦНС людини існує шість основних ізоформ тау, розмір яких варіюється від 352 до 441, завдяки альтернативному сплайсингу (Hanger, et al. "Trends Mol Med" 15:112-9, 2009). Ці ізоформи відрізняються одна від одної регульованим включенням 0-2 N-кінцевих вставок і 3 або 4 тандемні зв'язувальні мікротрубочки повторів, і позначаються як 0N3R (SEQ ID NO:1), 1N3R (SEQ ID NO:2), 2N3R (SEQ ID NO:3), 0N4R (SEQ ID NO:4), 1N4R (SEQ ID NO:5) і 2N4R (SEQ ID NO:6). Термін "контрольне тау", використовуваний у цьому документі, означає ізоформу тау SEQ ID NO:6, що не піддавалася фосфорилюванню й іншим посттрансляційним модифікаціям.

Тау-білок зв'язує мікротрубочки й регулює транспорт вантажів через клітини, процес, який може бути модульований фосфорилюванням тау-білків. При БА й подібних до неї розладах переважає патологічне фосфорилювання тау-білків, яке, як вважають, передувє і/або запускає агрегацію тау-білків у фібрили, які називаються парними спіральними філаментами (ПСФ). Основним компонентом ПСФ є гіперфосфориловане тау. Термін "парний спіральний філамент-тау" або "ПСФ-тау", використовуваний у цьому документі, означає добре відомі агрегати тау в парних спіральних філаментах. Під час дослідження методом електронної мікроскопії виявляються дві основні ділянки в структурі ПСФ, розмита оболонка й стрижневий філамент; чутлива до протеолізу розмита оболонка розташовується ззовні філамента, а протеазостійкий стрижень філамента утворює кістяк ПСФ (Wischik, et al. "Proc Natl Acad Sci USA" 85:4884-8, 1988).

"Антитіла, які зв'язують ПСФ-тау", використовувані у цьому документі, означають антитіла, які зв'язують ПСФ-тау при оцінці під час вестерн-блотингу. Зазвичай зв'язування антитіла до ПСФ-тау може бути оцінено за забарвленням Кумаси приблизно 500 нг ПСФ-тау після 1 години блокування в 5 % (маса/об'єм) знежиреному сухому молоці (NFDМ) у ТБС-Т, 0,05 % твін-20. Антитіла, які зв'язують ПСФ-тау, факультативно не зв'язують контрольне тау (SEQ ID NO:6) за результатами вимірювань за допомогою вестерн-блотингу під час дослідження в умовах антигенного навантаження, де обидва - контрольне тау й ПСФ-тау - однаково виявляються тау-антитілами, які не віддають перевагу епітопам ПСФ-тау (наприклад, антитіло НТ7, ("ThermoScientific", Рокфорд, Іллінойс) (Mercken, et al. "J Neurochem" 58:548-53, 1992). Такі приклади умов антигенного навантаження являють собою 500 нг ПСФ-тау і 200 нг контрольного тау.

У даному документі використані загальноприйняті одно- і трибуквені коди позначення амінокислот.

Композиції даного винаходу

Даний винахід стосується анти-ПСФ-тау антитіл і застосування цих антитіл. Такі анти-ПСФ-тау антитіла можуть мати властивості зв'язування фосфорилизованого епітопу на ПСФ-тау-білку або зв'язування нефосфорилизованого епітопу на ПСФ-тау-білку. Анти-ПСФ-тау-антитіла можуть використовуватися як лікарські засоби, як дослідницькі або діагностичні реагенти для виявлення ПСФ-тау-білка в біологічних пробах, наприклад у тканинах або клітинах.

Один варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальні ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 або 37, й антигензв'язувальні ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:36 або 38. У таблиці 1 показані залишки антигензв'язувальної ділянки прикладу антитіл, що розкриваються в даному винаході, позначені згідно з Kabat або Chothia, а також приклади ділянок важкого й легкого ланцюга.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальна ділянка VH антитіл, що розкриваються в даному винаході, містить ділянки важкого ланцюга (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3), які визначають комплементарність, SEQ ID NO:7, 8 і 9 або 13, 14 і 15, відповідно, або антигензв'язувальна ділянка VL антитіл, що розкриваються в даному винаході, містить CDR легкого ланцюга 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) SEQ ID NO:10, 11 і 12 або 16, 17 і 18, відповідно.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 або 37, й антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:36 або 38.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальна ділянка VH антитіл, що розкриваються в даному винаході, містить ділянки важкого ланцюга (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3), які визначають комплементарність, SEQ ID NO:7, 8 і 9 або 13, 14 і 15, відповідно, або антигензв'язувальна ділянка VL антитіл, що розкриваються в даному винаході, містить CDR легкого ланцюга 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) SEQ ID NO:10, 11 і 12 або 16, 17 і 18, відповідно.

Таблиця 1

Назва послідовності	SEQ ID NO:	Послідовність
PT1 HCDR1, Kabat	7	SSWMG
PT1 HCDR2, Kabat	8	DLPGSGGTNYNERFKG
PT1 HCDR3, Kabat	9	SYDYDRFAN
PT1 HCD R <sub>1</sub> , Kabat	10	RSSESLLHSNGNTYLY
PT1 LCDR2, Kabat	11	RMSNLAS
PT1 LCDR3, Kabat	12	MQYLEYPLT
PT3 HCDR1, Kabat	13	SYAMS
PT3 HCDR2, Kabat	14	SISKGGNTYYPNSVKG
PT3 HCDR3, Kabat	15	GWGDYGWFA
PT3 LCDR1, Kabat	16	KASQDINRYLN
PT3 LCDR2, Kabat	17	RANRLLD
PT3 LCDR3, Kabat	18	LQYDEFPLT
PT1 HCDR1, Chothia	19	GYTFSSS
PT1 HCD R <sub>2</sub> , Chothia	20	LPGSGG
PT1 HCDR3, Chothia	21	SYDYDRFA
PT1 LCD R <sub>1</sub> , Chothia	22	SESLLHSNGNTY
PT1 LCDR2, Chothia	23	RMS
PT1 LCDR3, Chothia	24	YLEYPL
PT3 HCD R <sub>1</sub> , Chothia	25	GFTFSSY
PT3 HCDR2, Chothia	26	SKGGN
PT3 HCDR3, Chothia	27	GWGDYGWFA
PT3 LCD R <sub>1</sub> , Chothia	28	SQDINRY
PT3 LCDR2, Chothia	29	RAN
PT3 LCDR3, Chothia	30	YDEFPL
PT1 VH	35	QVQLQQSGTELMKPGASVKISCKATGYTFS SSWMGWVKQRPBGHGLEWIGDILPGSGGTNY NERFKGKASFTAETSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYYCVRSYDYDRFANWGQGTTLTVSA
PT1 VL	36	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSESLLH SNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASG VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCM QYLEYPLTFGAGTKLELK
PT3 VH	37	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSY

Таблиця 1

Назва послідовності	SEQ ID NO:	Послідовність
		AMSWVRQNPEKRLEWVASISKGGNTYYPNVSK GRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTALYYCARG WGDYGWFAWYGQVTLVTVSA
PT3 VL	38	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRY LNWFQKPKGKSPKTLIYRANRLLDGVPSRFSG SGSGQDYSLTISSLDYEDMGIIYYCLQYDEFPLT FGDGTKLELK

Хоча варіанти здійснення, проілюстровані в прикладах, містять варіабельні ділянки, одну із важкого й одну із легкого ланцюга, фахівці розуміють, що альтернативні варіанти здійснення можуть містити різні варіабельні ділянки важкого або легкого ланцюга. Поодинокі варіабельні ділянки можуть використовуватися для скринінгу варіабельного домену, здатного до формування дводоменного специфічного антигензв'язувального фрагмента, здатного, наприклад, зв'язуватися з ПСФ-тау. Такий скринінг може здійснюватися за допомогою методів фагового дисплея, наприклад, із використанням ієрархічного подвійного комбінаторного підходу, описаного в PCT Publ. № WO92/01047. Згідно з цим підходом індивідуальна колонія, яка містить клон Н або L ланцюгів, використовується для інфікування всієї бібліотеки клонів, які кодуєть інший ланцюг (L або H), і утворений дволанцюговий специфічний антигензв'язувальний домен селективно відбирається відповідно до методів фагового дисплея.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: або 36.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:37 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: або 38.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ділянки важкого ланцюга (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) SEQ ID NO:7, 8 і 9, відповідно, що містять ПСФ-тау-білки та визначають комплементарність, і CDR легкого ланцюга 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) SEQ ID NO:10, 11 і 12, відповідно.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язує ділянки важкого ланцюга (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) SEQ ID NO:13, 14 і 14, відповідно, що містять ПСФ-тау-білки та визначають комплементарність, і CDR легкого ланцюга 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) SEQ ID NO:16, 17 і 18, відповідно.

У будь-якому з наведених вище варіантів здійснення виділене антитіло, що зв'язує ПСФ-тау-білок, може бути гуманізоване.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути створені з використанням різних методів, наприклад гібридомний метод (Kohler і Milstein "Nature" 256:495-7, 1975). Химерні мкАТ, що містять варіабельну ділянку легкого й важкого ланцюга, отримані з донорного антитіла (зазвичай мишачого) в поєднанні з постійними ділянками легкого й важкого ланцюгів, отримані з акцепторного антитіла (зазвичай іншого виду ссавців, наприклад, людини), можна отримати методом, розкритим в патенті № 4816567. Можна приготувати мкАТ із прищепленими на них CDR, що мають CDR, отримані з імуноглобуліну донора нелюдського походження (зазвичай, миші), і частини молекули імуноглобуліну, що залишилися, отриманої з одного або більше людських імуноглобулінів, за допомогою методів, відомих у цій галузі, такими як розкриті в патенті США № 5225539. Повністю людські мкАТ, що не містять жодної екзогенної послідовності, можуть отримуватися від мишей, які мають людський трансген, за допомогою описаних методів Lonberg і співавт., Nature 368:856-9, 1994, Fishwild et al., «Nat Biotechnol» 14:845-51, 1996, Mendez et al. «Nat Genet» 15:146-56, 1997. Людські мкАТ можуть бути також приготовлені й оптимізовані з використанням фагових бібліотек (Knappik, et al. "J Mol Biol" 296:57-86, 2000, Krebs, et al. "J Immunol Methods" 254:67-84, 2001, Shi, et al. "J Mol Biol" 397:385-96, 2010).

Гуманізація антитіла може бути виконана за допомогою добре відомих методів, таких як ремоделювання поверхні залишків (SDRR), які визначають специфічність (U.S. Publ. № 2010/0261620), ремоделювання поверхні (Padlan et al. "Mol. Immunol". 28:489-98, 1991), супергуманізація (Int. Pat. Publ. № WO04/006955) і супергуманізація на основі виявлення й видалення з імуноглобуліну миші потенційних епітопів для головного комплексу гістосумісності й Т-клітини (патент США № 7657380). Людські каркасні послідовності, використовувані для

щеплення/гуманізації, можуть вибиратися фахівцями в цій галузі з відповідних баз даних. Вибрані каркаси можуть бути далі модифіковані для збереження або поліпшення зв'язувальної афінності з використанням методів, викладених Queen et al. (Queen, et al. "Proc Natl Acad Sci USA" 86:10029-33, 1989) або в U.S. Publ. № 2011/0092372.

Приготування ПСФ-тау для використання як антигену для імунізації або виділення антитіл із фагових бібліотек може бути здійснене за допомогою будь-яких придатних методів. У прикладі способу ПСФ-тау-білок ізолюють із головного мозку пацієнтів із БА за допомогою добре відомих протоколів, таких як описані Greenberg і Davies (Greenberg and Davies "Proc Natl Acad Sci USA" 87:5827-31, 1990). ПСФ-тау-білок може бути виділений із кори головного мозку хворого на хворобу Альцгеймера після його смерті. Виділений ПСФ-тау-білок характеризується за чистотою й статусом гіперфосфорилування з антитілами, які вступають у реакцію з ПСФ-тау. У типовому препараті ПСФ-тау-білка, гіперфосфорилувані смуги, що переміщуються при приблизно 60, 64, 68 і 72 кДа під час проведення вестерн-блотингу (Spillantini and Goedert Trends Neurosci 21:428-33, 1998), виявляються антитілом AT8, яке специфічно зв'язує гіперфосфорилований ПСФ-тау, але не зв'язує дефосфорилований ПСФ-тау-білок.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть мати характеристики незв'язування контрольного тау-білка SEQ ID NO:6. Такі антитіла можуть продукуватися з використанням способів, описаних вище, і випробування антитіл на відсутність зв'язування з контрольним тау може проводитися під час вестерн-блотингу з подальшим забарвлюванням Кумасси відповідно до описаного вище. Контрольне тау може рекомбінантно експресуватися й очищатися з використанням стандартних способів. Прикладами антитіл, які зв'язують ПСФ-тау-білок, але не зв'язують контрольне тау, є антитіла PT1 і PT3. Далі може оцінюватися специфічність антитіл, що розкриваються в даному винаході, наприклад, із використанням імуногістохімічного дослідження контрольних зрізів головного мозку й зрізів головного мозку, ураженого БА.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть мати афінності до ПСФ-тау з константою дисоціації ( $K_D$ ) нижче або такою, що дорівнює приблизно  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  або  $10^{-12}$  М. Афінність даної молекули для ПСФ-тау-білка може бути визначена експериментально з використанням будь-якого придатного способу. Такі способи можуть включати використання апаратури Biacore, ProteOn або KinExA, ІФА або конкурентно-зв'язувальний аналіз, добре відомі фахівцям.

Інший аспект винаходу являє собою виділене антитіло або фрагмент, які конкурують за зв'язування ПСФ-тау з моноклональним антитілом, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:36, або антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:37 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:38.

Аналіз конкуренції за зв'язування з ПСФ-тау може бути проведений in vitro за допомогою добре відомих способів. Наприклад, зв'язування антитіла, міченого NHS-ефіром MSD Sulfo-Tag™, з ПСФ-тау в присутності неміченого антитіла може бути оцінено за допомогою імуноаналізу з подальшим електрохемилюмінесцентним детектуванням.

Для визначення епітопу антитіл, що розкриваються в даному винаході, можуть використовуватися декілька добре відомих методик у доповнення до конкурентно-зв'язувального аналізу. Наприклад, у випадку, коли відома структура обох з окремих компонентів, може бути використаний аналіз in silico прикріплення одного білка до іншого з метою ідентифікації ділянок, сумісних для взаємодії. Може бути проведене вибіркове заміщення водню дейтерієм у антигені й антитілі з метою визначення ділянок антигену, здатних зв'язуватися з антитілом. Сегментний і точковий мутагенез, які модифікують антиген, можуть використовуватися для локалізації необхідних для зв'язування антитіла амінокислот. Спів-кристалічна структура комплексу антиген-антитіло використовується для ідентифікації залишків, що беруть участь в утворенні епітопу й паратопу.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть являти собою моноклональні антитіла ізотопів IgG, IgD, IgA або IgM. Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути біспецифічними або поліспецифічними. Приклад біспецифічного антитіла може зв'язувати два окремі епітопи на ПСФ-тау або може зв'язувати ПСФ-тау й бета-амілоїд (Aβ). Інший приклад біспецифічного антитіла може зв'язувати ПСФ-тау-білок і рецептор ендogenous трансцитозу через гематоенцефалічний бар'єр, такий як інсуліновий рецептор, трансфериновий рецептор, рецептор інсуліноподібного фактора I і ліпопротеїновий рецептор. Прикладом антитіла є IgG 1 типу.

Імуноефекторні властивості антитіл, що розкриваються в даному винаході, також можуть бути посилені або послаблені за рахунок модифікацій Fc-фрагмента із застосуванням способів,



добре відомих фахівцям. Наприклад, ефекторні функції Fc-фрагмента, такі як зв'язування C1q, комплементзалежна цитотоксичність (CDC), антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC), фагоцитоз, понижувальна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептора В-клітини; BCR) тощо може забезпечуватися й контролюватися модифікуючими залишками в Fc-фрагменті, відповідальними за ці дії. Залишки в Fc-домені, які мутували, що збільшували напівжиття антитіл, можуть також поліпшити фармакокінетичні властивості (Strohl "Curr Opin Biotechnol" 20:685-91, 2009).

Окрім того антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути модифіковані посттрансляційно за рахунок таких процесів, як глікозилювання, ізомеризація, деглікозилювання або ненатуральна ковалентна модифікація, така як приєднання нативної молекули поліетилгліколю (пегілювання) або ліпідизація. Такі модифікації можуть відбуватися в умовах *in vivo* або *in vitro*. Наприклад, антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути кон'юговані з поліетиленгліколем (пегільовані) з метою поліпшення їх фармакокінетичних профілів. Кон'югація може бути виконана за допомогою способів, відомих фахівцям у даній галузі. Зазначено, що кон'югація терапевтичних антитіл із ПЕГ поліпшує фармакодинаміку, не впливаючи на функцію (Knight, et al. "Platelets" 15:409-18, 2004, Leong, et al. Cytokine 16:106-19, 2001, Yang, et al. Protein Eng 16:761-70, 2003).

Інший варіант здійснення винаходу являє собою виділений полінуклеотид, кодуючі антитіла, що розкриваються в даному винаході, або їх комплемент, або їх фрагменти. Приклади виділених полінуклеотидів являють собою полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, що містять CDR важкого ланцюга імунoglobуліну HCDR1, HCDR2 і HCDR3, показані в SEQ ID NO:7, 8 і 9 або 13, 14 і 15, відповідно, або поліпептиди, що містять CDR легкого ланцюга імунoglobуліну LCDR1, LCDR2 і LCDR3, показані в SEQ ID NO:10, 11 і 12 або 16, 17 і 18, відповідно, і полінуклеотиди, що мають послідовність, показану в SEQ ID NO:31-34, які кодують варіабельні ділянки, що розкриваються в даному винаході. Інші полінуклеотиди, які, беручи до уваги виродженість генетичного коду або перевагу використання кодонів у даній експресійній системі, кодують запропоновані антитіла, що розкриваються в даному винаході, також входять в об'єм даного винаходу. Виділені нуклеїнові кислоти, що розкриваються в даному винаході, можуть бути виготовлені з використанням добре відомих методів рекомбінації або синтезу. ДНК, які кодують моноклональні антитіла, легко ізолюються й секвенуються за допомогою методів, відомих фахівцям у даній галузі. При створенні гібридом такі клітини можуть слугувати джерелом такої ДНК. В альтернативному випадку, під час використання методу дисплея зі злиттям кодуючої послідовності й продукту трансляції (наприклад, фагових або рибосомальних бібліотек), селекція зв'язувальної ланки й нуклеїнової кислоти спрощена. Після фагової селекції ділянки фага, що кодують антитіло, можна виділяти й використовувати для синтезу цілих антитіл, включаючи людські, або будь-яких інших бажаних антигензв'язувальних фрагментів, й експресувати в будь-якому бажаному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою вектор, що містить щонайменше один полінуклеотид, що розкривається в даному винаході. Такі вектори можуть бути плазмідними, вірусними векторами, векторами на основі транспозонів або будь-якими іншими векторами, придатними для інтродукції запропонованих у даному винаході полінуклеотидів у цей організм або в це генетичне оточення будь-якими засобами.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою клітину-хазяїна, яка містить будь-який із полінуклеотидів, що розкриваються в даному винаході. Такими клітинами-хазяїнами можуть бути еукаріотичні, бактеріальні, рослинні клітини або клітини архей. Прикладами еукаріотичних клітин можуть бути клітини ссавців, комах, птахів або інші клітини тваринного походження. Еукаріотичні клітини ссавців містять у собі безсмертні клітинні лінії, такі як гібридами або клітинні лінії мієломи, наприклад SP2/0 (Американська колекція типових культур (ATCC), Манассас, VA, CRL-1581), NS0 (Європейська колекція клітинних культур (ECACC), Солсбері, Уїлтшир, Великобританія, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) і Ag653 (ATCC CRL-1580) мишачі клітинні лінії. Зазвичай використовується лінія клітин мієломи людини U266 (ATCC CRL-TIB-196). Інші використовувані клітинні лінії включають лінії, отримані з яєчників китайського хом'ячка (CHO), наприклад, лінії CHO-K1SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) або DG44.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою спосіб отримання антитіла, здатного зв'язувати ПСФ-тау-білки, що містить культивування клітин-хазяїнів, що розкриваються в даному винаході, і вилучення антитіл, які продукуються клітинами-хазяїнами. Способи створення й очищення антитіл добре відомі фахівцям у даній галузі.

Способи терапії

Анти-ПСФ-тау-антитіла, що розкриваються в даному винаході, або їх фрагменти, включаючи фрагменти Fab, (Fab')<sub>2</sub>, scFv, або антитіла, які містять антигензв'язувальну ділянку антитіл, що розкриваються в даному винаході, також можуть використовуватися для лікування, послаблення або профілактики симптомів у пацієнтів із нейродегенеративним захворюванням, для якого характерна патологічна агрегація тау в головному мозку, таких, як пацієнти, що страждають на БА або на будь-яку іншу таупатію. Без наміру бути зв'язаними межами якої-небудь конкретної теорії, антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть по своєму позитивно діяти за допомогою зменшення патологічної агрегації тау-білка й, відповідно, кількості ПСФ-тау в головному мозку. Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть використовуватися для лікування будь-якої хворої тварини. Прикладами таких тварин можуть бути ссавці, такі як людина, гризуни, собаки, кішки й сільськогосподарські тварини. Наприклад, антитіла, що розкриваються в даному винаході, також придатні для приготування лікарських засобів для терапії БА, при цьому лікарський засіб приготований для введення в дозуваннях, визначених у даному документі.

Інший варіант здійснення винаходу являє собою спосіб зменшення агрегації тау в пацієнтів, які потребують цього, що містить введення пацієнту терапевтично ефективної кількості виділеного антитіла, що розкривається в даному винаході, упродовж часу, необхідного для зменшення агрегації тау.

Інший варіант здійснення, що розкривається в даному винаході, являє собою спосіб лікування або ослаблення симптомів нейродегенеративного захворювання, для якого характерна агрегація тау в організмі пацієнта, який містить введення пацієнту терапевтично ефективної кількості виділеного антитіла, що розкривається в даному винаході, упродовж часу, необхідного для лікування або послаблення симптомів нейродегенеративного захворювання.

У будь-якому з варіантів здійснення, указаних вище, нейродегенеративне захворювання, що включає агрегацію тау, є таупатією.

У будь-якому з варіантів здійснення, вказаних вище, виділене антитіло містить антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:35 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:36.

У будь-якому з варіантів здійснення, вказаних вище, виділене антитіло містить антитіло, яке зв'язує ПСФ-тау, що містить антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:37 і антигензв'язувальну ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 38.

Використовувана у даному документі "таупатія" охоплює будь-яке нейродегенеративне захворювання, для якого характерна патологічна агрегація тау в головному мозку. У доповнення до спадкової й спорадичної БА, інші приклади таупатій включають лобово-скроневу деменцію з паркінсонізмом, зв'язану з хромосомою 17 (FTDP-17), прогресуючий над'ядерний параліч, кортикобазальну дегенерацію, деменцію Піка, прогресивний субкортикальний гліоз, деменцію з утворенням тільки клубків, дифузні нейрофібрилярні клубки з кальцифікацією, деменцію з аргірофільними зернистими кулями, комплекс боковий аміотрофічний склероз-деменція-паркінсонізм, синдром Дауна, синдром Герстманна-Штреуслера-Шейнкера, хворобу Галервордена-Шпатца, міозит із включеними тільцями, хворобу Крейцфельда-Якоба, множинну системну атрофію, ліпоїдний гістіоцитоз тип С, церебральну амілоїдну ангіопатію з відкладенням пріонного білка, підгострий склерозуючий паненцефаліт, дисаміотрофічну міотонію, боковий аміоаміотрофічний склероз із нейрофібрилярними клубками, постенцефалітичний паркінсонізм і хронічну травматичну енцефалопатію, таку як *dementia pugilistica* (кулачна хвороба). (Morris, et al. *Neuron* 70:410-26, 2011).

Поведінковий фенотип, пов'язаний із таупатією, включає в себе порушення когнітивних функцій, ранню зміну особистості й розгальмованість, апатію, абулію, мутацізм, апраксію, персерверацію, стереотипні рухи/поведінка, гіпероральність, дезорганізацію, нездатність планування або виконання послідовних дій, егоїзм/грубість, антигромадські особисті риси, відсутність співчуття, безграмотне мовлення, що збивається, з частими фразеологічними помилками, але відносно збережене розуміння, порушене розуміння й складнощі з пошуком слів, повільно прогресуючу нестійкість ходи, ретропульсію, замирання, часті падіння, ригідність другого шийного хребця, що не відповідає на введення леводопи, над'ядерний параліч погляду, судомне сіпання очних яблук із характерним прямокутним сигналом, повільні вертикальні сакади, псевдобульбарний синдром, апраксію кінцівок, дистонію, втрату коркової чутливості й тремор.

Пацієнти, що підлягають лікуванню, включають безсимптомних осіб із ризиком розвитку БА або іншої таупатії, а також пацієнтів, у яких симптоми виявляються в даний час. Пацієнти, що

підлягають лікуванню, включають осіб із відомим генетичним ризиком розвитку БА, таким як сімейний анамнез БА або наявність генетичних факторів ризику в геномі. Приклади факторів ризику являють собою мутації білка-попередника амілоїду (APP), особливо в положенні 717 і положеннях 670 і 671 (мутація Харді і Шведська мутація відповідно). Інші фактори ризику являють собою мутації генів пресеніліну, PS1 і PS2, і ApoE4, сімейний анамнез гіперхолестеролемії або атеросклерозу. Осіб, що страждають на БА в даний час, можна відрізнити від старечої деменції за наявністю факторів ризику, описаних вище. Додатково, доступно декілька діагностичних тестів для виявлення осіб, що страждають на БА. Ці тести включають вимірювання вмісту тау в спинномозковій рідині й рівні A $\beta$ 42. Підвищений рівень тау й знижені рівні A $\beta$ 42 свідчать про присутність БА. Особи, що страждають на БА, можуть бути також діагностовані згідно з критеріями Асоціації хвороби Альцгеймера й розладів, що до неї належать.

#### Введення/Фармацевтичні композиції

Анти-ПСФ-тау-антитіла, що розкриваються в даному винаході, придатні як терапевтичні, так і профілактичні агенти для лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань, для яких характерна патологічна агрегація тау, таких як БА або інші таупатії. Лікування безсимптомних пацієнтів можна починати в будь-якому віці (наприклад, приблизно в 10, 15, 20, 25, 30 років). Зазвичай, однак, немає необхідності починати лікування, доки пацієнт не досягне віку приблизно 40, 50, 60 або 70 років. Лікування зазвичай включає в себе багаторазове введення препаратів упродовж деякого періоду часу. Лікування можна моніторувати за допомогою кількісного визначення антитіла, або відповіді активованих Т-клітин або В-клітин на терапевтичний агент упродовж певного часу. Під час зниження відповіді показано збільшення дози введення.

Застосовуючи в профілактичних цілях, фармацевтичні композиції або лікарські препарати вводяться пацієнту, схильному в тій або іншій формі до ризику розвитку БА, у дозі, достатній для усунення або зниження ризику, ослаблення ступеня тяжкості або відкладання настання захворювання на пізніший термін, включаючи біохімічні, гістологічні і/або поведінкові симптоми захворювання, його ускладнення й проміжні патологічні фенотипи, що спостерігаються під час розвитку захворювання. Застосовуючи в терапевтичних цілях, композиції або препарати вводяться пацієнту, у якого підозрюють або вже діагностували таке захворювання, у дозі, достатній для зниження, припинення або відкладання настання будь-яких симптомів захворювання (біохімічних, гістологічних і/або поведінкових). Введення лікарського препарату може послабити або усунути порушення когнітивних функцій легкого ступеня у пацієнтів, у яких ще не розвинулася патологія, характерна для хвороби Альцгеймера. Кількість, необхідна для лікування або профілактики, позначається як терапевтично- або профілактично-ефективна доза. В обох, профілактичному й терапевтичному, режимах композиції або лікарські препарати зазвичай вводяться в декількох дозах, поки не буде досягнута достатня імунна відповідь.

Анти-ПСФ-тау-антитіла або їх фрагменти, що розкриваються в даному винаході, можуть вводитися в поєднанні з іншими агентами, що виявляють ефективність під час лікування споріднених нейродегенеративних захворювань. У випадку БА антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть вводитися в поєднанні з агентами, які знижують або запобігають відкладенню бета-амілоїду (A $\beta$ ). Є можливим, що патології, пов'язані з ПСФ-тау-білком і A $\beta$ , мають синергічний характер A $\beta$ . Тому комбінована терапія, спрямована на одночасне усунення як патологій, зумовлених ПСФ-тау-білком, так і патологій, зумовлених A $\beta$ , може бути ефективнішою, ніж терапія, спрямована на кожний із цих білків окремо.

У випадку хвороби Паркінсона й нейродегенеративних захворювань, що стосуються її, імунна модуляція з метою усунення агрегованих форм білка  $\alpha$ -синуклеїну також є перспективною терапією. Комбінована терапія, спрямована на одночасне усунення обох із тау й білка  $\alpha$ -синуклеїну може бути ефективнішою, ніж терапія, спрямована на кожний із цих білків окремо.

Застосовуючи способи, що розкриваються в даному винаході, "терапевтично ефективна кількість" антитіла для лікування або ослаблення симптомів таупатії може бути визначена за допомогою стандартних дослідницьких методик. Наприклад, доза антитіла може бути визначена за допомогою введення агента тваринам під час досліджень на придатних тваринних моделях, добре відомих фахівцям у даній галузі.

Додатково, для визначення оптимального діапазону доз можуть бути додатково використані аналізи кількісного визначення в умовах *in vitro*. Вибір конкретної ефективної дози (наприклад, за допомогою клінічних випробувань) може бути здійснений фахівцями на основі декількох факторів. Такими факторами є: захворювання, що підлягає лікуванню або профілактиці, симптоми захворювання, маса тіла пацієнта, імунологічний статус пацієнта й інші відомі

фахівцям фактори. Точна доза, призначена для застосування у складі композиції, залежить від способу введення препарату й тяжкості хвороби, і повинна визначатися на основі рішення лікаря й стану кожного пацієнта. Ефективна доза може бути екстрапольована, виходячи з кривої залежності доза-ефект за даними, отриманими в умовах *in vitro* або на тест-системах у тваринних моделях.

Спосіб введення антитіл для терапевтичного використання може являти собою будь-який відповідний шлях введення, який доставляє агент у організм пацієнта. Фармацевтичні композиції цих антитіл придатні для парентерального введення, наприклад, внутрішньошкірного, внутрішньом'язового, внутрішньочеревинного, внутрішньовенного, підшкірного, інтраназального або інтракраніального, або вони можуть бути введені в спинномозкову рідину головного мозку або хребта.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути виготовлені як фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість антитіла як активний інгредієнт у фармацевтично прийнятному носії. Термін "носій" стосується розріджувачів, ад'ювантів, допоміжних речовин або несучого середовища, із якими вводиться антитіло. Фармацевтичне несуче середовище може являти собою рідину, таку як вода або масла, включаючи масла нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія й подібні до них масла. Наприклад, можуть використовуватися 0,4 % сольовий розчин і 0,3 % розчин гліцину. Вказані розчини стерильні й загалом не містять механічних включень. Стерилізація проводиться з використанням загальноприйнятих, добре відомих способів стерилізації (наприклад, фільтрацією). Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, таких як речовини корегування рН, буферні речовини, стабілізатори, згущувальні речовини, лубриканти й забарвлюючі добавки тощо. Концентрація антитіл, що розкриваються в даному винаході, агента в такому фармацевтичному складі може варіюватися в широкому діапазоні, тобто, від менш ніж приблизно 0,5 %, зазвичай щонайменше приблизно 1 %, до 15 або 20 % за масою, і вибирається, насамперед, з урахуванням необхідної дози, об'єму рідини, в'язкості тощо, згідно з конкретно вибраним способом введення.

Терапія може являти собою режим однократного дозування або режим багаторазового дозування, при цьому початковий курс лікування може складатися з 1-10 доз, із подальшим введенням інших доз через певні проміжки часу, необхідні для збереження або посилення відповіді, наприклад, через 1-4 місяці - введення другої дози і, за необхідності, ще через декілька місяців - введення подальшої дози. Приклади придатних схем лікування включають: (I) 0, 1 місяць і 6 місяців, (II) 0, 7 днів і 1 місяць, (III) 0 і 1 місяць, (IV) 0 і 6 місяців, або інші схеми, що дозволяють отримати бажану відповідь, за якої очікується послаблення симптомів захворювання або ступеня тяжкості захворювання.

Таким чином, фармацевтичні композиції для внутрішньом'язового введення, що розкриваються в даному винаході, можуть містити 1 мл стерильного забуференого водного розчину й від приблизно 1 нг до приблизно 100 мг, від приблизно 50 нг до приблизно 30 мг, або від приблизно 5 мг до приблизно 25 мг антитіла, що розкривається в даному винаході. Аналогічно, фармацевтична композиція для внутрішньом'язового введення, що розкривається в даному винаході, може містити приблизно 250 мл стерильного розчину Рінгера й від приблизно 1 мг до приблизно 30 мг, або від приблизно 5 мг до приблизно 25 мг антитіла, що розкривається в даному винаході. Способи виготовлення композицій для парентерального введення добре відомі й описані детальніше, наприклад, у "Remington's Pharmaceutical Science", 15-е вид., Mack Publishing Company, Істон, Пенсільванія.

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть бути ліофілізовані для зберігання й відновлені у відповідному носії перед використанням. Цей спосіб зарекомендував себе ефективним способом для антитіл та інших білкових препаратів, і можуть використовуватися відомі фахівцям методики ліофілізації й відновлення.

#### Діагностичні методи й набори

Антитіла, що розкриваються в даному винаході, можуть використовуватися в способах діагностування БА або інших таупатій у пацієнта. Цей спосіб включає виявлення у пацієнта наявності ПСФ-тау за допомогою діагностичного реагенту, такого як антитіло або його фрагмент, що розкривається в даному винаході.

ПСФ-тау-білок може бути виявлений у біологічній пробі, забраній у пацієнта (наприклад, крові, сечі, спинномозковій рідині), за допомогою контактування біологічної проби з діагностичним реагентом, що містить антитіло з ПСФ-тау-білком у пробі, забраній у пацієнта. Аналізи, що проводяться для виявлення, включають добре відомі способи, такі як ІФА, імуногістохімічне дослідження, вестерн-блотинг або *in vivo* візуалізація. Приклади діагностичних

антитіл являють собою антитіла PT1 і PT3, що розкриваються в даному винаході, і стосуються IgG1, к типу.

Діагностичні антитіла або аналогічні реагенти можуть бути введені внутрішньовенно в організм пацієнта або безпосередньо в головний мозок будь-яким придатним шляхом, який доставляє агент в організм пацієнта відповідно до прикладів, наведених вище. Доза антитіла повинна знаходитися в тих самих межах, що й доза для лікування. Зазвичай антитіло мітять, хоча під час застосування деяких способів первинне антитіло з афінністю до ПСФ-тау-білка залишається неміченим, і для зв'язування з первинним антитілом використовують вторинний агент для мічення. Вибір мітки залежить від засобу виявлення. Наприклад, флуоресцентна мітка придатна для виявлення оптичними методами. Використання парамагнітної мітки підходить для виявлення методом томографії без хірургічного втручання. Радіоактивні мітки можуть бути також виявлені за допомогою ПЕТ або ОФЕКТ.

Діагноз виконання за допомогою порівняння кількості, розміру і/або інтенсивності міченого ПСФ-тау, агрегатів тау і/або нейрофібрилярних клубків у пробі, забраній у пацієнта або в організмі пацієнта, із відповідними вихідними значеннями. Вихідні значення можуть являти собою середні рівні у популяції здорових людей. Вихідні значення можуть також являти собою попередні рівні, визначені у того самого пацієнта.

Діагностичні способи, описані вище, можуть також використовуватися для моніторингу відповіді пацієнта на терапію шляхом виявлення наявності ПСФ-тау в організмі пацієнта до, упродовж або після лікування. Зниження значень відносно вихідного рівня свідчить про позитивну відповідь на лікування. Величини можуть також тимчасово підвищуватися в біологічних рідинах у міру того, як патологічні тау-білки виводяться з головного мозку.

Даний винахід далі спрямований на створення набору для виконання досліджень описаними вище діагностичними способами й способами моніторингу. Типово, такий набір містить діагностичний реагент, такий як антитіла, що розкриваються в даному винаході, і як опцію - виявлювану мітку. Діагностичне антитіло саме по собі може містити виявлювану мітку (наприклад, флуоресцентну молекулу, біотин, тощо), яка виявляється безпосередньо або виявляється через вторинну реакцію (наприклад, реакція зі стрептавідином). Альтернативно може використовуватися другий реагент, що містить виявлювану мітку, при цьому другий реагент має специфічність зв'язування з первинним антитілом. У діагностичному наборі, придатному для вимірювання ПСФ-тау в біологічній пробі, антитіла в наборі можуть підставлятися заздалегідь зв'язаними з твердою фазою, такою як ямки мікротитраційного планшета.

Усі цитовані посилання (включаючи книги, видані патенти, опубліковані заявки на патент і одночасно заявку на патент того самого заявника, що знаходиться на розгляді), цитовані в тексті цієї заявки, включені у зміст даної заявки шляхом посилання.

#### Приклад 1

Очищення парного спірального філамента-тау (ПСФ-тау)

ПСФ-тау-білок був частково очищений способом Greenberg і Davies із модифікаціями (Greenberg and Davies Proc Natl Acad Sci USA 87:5827-31, 1990). Коротко, тканина, отримана посмертно з кори головного мозку пацієнта з підтвердженою гістологічно хворобою Альцгеймера, була частково очищена. Типово, 5 мг лобової частки гомогенізували в 10 об. охолодженого буферного розчину Буфер Н (10 мМ Tris, 800 мМ NaCl, 1 мМ ЕГТК і 10 % сахароза/рН 7,4) із використанням гомогенізатора тканини Поттера зі скла/тефлону (компанія "IKA Works, Inc"; Стауфен, Німеччина) зі швидкістю 1000 об/хв. Гомогенізований матеріал центрифугували при 264,8 N (27000g) упродовж 20 хв. у роторі Sorvall SS34. Відкидали осад, і супернатант доводили до кінцевої концентрації, що становить 1 % (маса/об'єм) N-лауроїлсаркозину й 1 % (за об'ємом) 2-меркаптоетанолу, й інкубували впродовж 2 годин при температурі 37°C. Потім супернатант центрифугували при 1059,1 N (108000g) упродовж 35 хв. при температурі 20°C у роторі Beckman 60Ti. Осад обережно вимивали в 3ФР і суспендували в 3ФР. Супернатант центрифугували повторно відповідно до описаного, й кінцевий осад розчиняли, брали аліквоти й заморожували при температурі -80°C. Якість препаратів ПСФ-тау оцінювали на 12 % ДСН-поліакриламідного гелю й проводили вестерн-блотинг із анти-тау-антитілами AT8 і HT7 (компанія "ThermoScientific", Рокфорд, Іллінойс). AT8 виявляє ПСФ-тау-білок фосфорилований за S202/T205, але не зв'язується з нефосфорилованим ПСФ-тау-білком або з тау-білком дикого типу. HT7 зв'язується з нефосфорилованим епітопом на амінокислотах 159-163 тау (SEQ ID NO: 6) і розпізнає як тау-білок, так і ПСФ-тау-білок. Препарат ПСФ-тау належної якості складається з 4 смуг, що мають молекулярну масу приблизно 60, 64, 66 і 72 кДа при детектуванні під час вестерн-блотингу за допомогою антитіла, яке реагує з гіпфосфорилованим ПСФ-тау-білком, таким як AT8. З однієї й тієї самої проби головного мозку

були приготовані два окремі препарати ПСФ-тау порівняної якості й чистоти. Препарат 1 використали для імунізації.

#### Приклад 2

##### Генерація моноклональних антитіл проти ПСФ-тау

5 Анти-ПСФ-тау-антитіла генерували з використанням стандартного методу гібридоми на нормальних мишах лінії Balb/c (Kohler and Milstein Nature 256:495-7, 1975). Отримані гібридоми засівали в 96-ямові планшети й через 10 днів проводили прямий ТІФА ПСФ-тау в кількості 25 нг на ямку відповідно до описаного нижче. Позитивні клітини тестували на перехресну реактивність на контрольному тау-білку в кількості 10 нг на ямку (SEQ ID NO:6), експресованому в клітинах E. Coli BL21 й очищеному за допомогою теплової обробки й осадження сульфатом амонію, і відразу субклонували, позитивні клони заморожували в рідкому азоті. Усі гібридоми вирошували в модифікованому за способом Дульбекко середовищі Голка з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки ("Hyclone", Європа), добавки HFCS для злиття й клонування гібридами (2 %) ("Roche", Брюссель, Бельгія), 2 % НТ ("Sigma", США), 1 мМ пірувату натрію, 2

15 мМ L-глутаміну й пеніциліну (100 ЕД/мл) і стрептомицину (50 мг/мл).

Варіабельні ділянки антитіл із селектованих клітин гібридами клонували в IgG1/IgG2/ к оточенні й експресували й очищали, використовуючи стандартні способи.

##### Прямий ІФА для селекції антитіла

20 ПСФ-тау-білок у кількості 25 нг/ямку витримували впродовж ночі при температурі 4°C у 96-ямових мікротитраційних планшетах NUNC Maxisorp ("Life Technologies") із плоским дном і поверхнею, що забезпечує високий ступінь зв'язування, у буфері (10 мМ Tris, 10 мМ NaCl і 10 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8,5) у кількості 50 мкл на ямку. Наступного дня планшети блокували 0,1 % казеїну в ЗФР у кількості 75 мкл на ямку впродовж 60 хв. при кімнатній температурі. Потім додавали 50 мкл супернатанту гібридами й інкубували впродовж 1 години при температурі 37°C. Після відмивання зв'язані моноклональні антитіла детектували з антимишачим овечим IgG, кон'югованим із пероксидазою хрину в кількості 50 мкл на ямку впродовж 1 години при температурі 37°C ("Amersham-Pharmacia Biotech"). Обидва реагенти розбавляли 0,1 % казеїн/ЗФР. Планшети відмивали, і 50 мкл розчину 0,42 мМ 3,3', 5' -тетраметилбензидину, 0,003 % (за об'ємом) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у 100 мМ лимонної кислоти й 100 мМ фосфорнокислого натрію

30 двозаміщеного (pH 4,3) додавали як субстрат. Залишали на струшувачі планшетів для проведення реакції максимум на 15 хв. при кімнатній температурі, після чого зупиняли розвиток забарвлювання за допомогою 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у кількості 50 мкл на ямку, і дані планшетів зчитували на рідері мікропланшетів із довжиною хвилі 450 нм ("Thermomax", компанія "Molecular Devices").

##### Специфічність моноклональних антитіл

35 Селектовані антитіла, отримані в результаті тесту гібридом, тестували на їх перехресну реактивність із рекомбінантно експресованим контрольним тау-білком (SEQ ID NO:6). 500 нг ПСФ-тау й 200 нг контрольного тау завантажували в 4-12 % гель NuPAGE® Novex® Bis-Tris і блотували на нітроцелюлозній мембрані з використанням системи iBlot (компанія "Invitrogen") відповідно до інструкцій виробника. Мембрани блокували впродовж 1 години з розчином тріс-буфера з NaCl і з Твін 20 (TBS-T; 1 М тріс, 150 мМ NaCl і 0,05 % Твін-20, pH 8,5), що містить знежирене сухе молоко (NFDM) (5 % маса/об'єм; "Biorad"), і відмивали тричі в TBS-T. Інкубували з первинними контрольними антитілами (1 мкг/мл) HT7, AT8, AT100 ("ThermoScientific", Рокфорд, Іллінойс), і BT2 розводили в TBS-T, що містить NFDM (5 % маса/об'єм), упродовж ночі при температурі 4°C. Моноклональні антитіла PT1, PT2, PT3, PT4 і PT5, селектовані за

45 результатами тесту гібридом, додавали в супернатант культури, що містить 10 % ФБС. Первинні антитіла детектували з використанням антимишачого овечого Ig, кон'югованого з HRPO (1:20000 в TBS-T, "Amersham Biosciences"), методом посиленої хемілюмінесценції за допомогою системи West Dura® ("Pierce", "Thermoscientific"). Сигнали реєстрували за допомогою системи люмінесцентної візуалізації ("Roche Diagnostic"). PT1 і PT3 реагували з ПСФ-тау-білком, але не реагували з контрольним тау-білком за результатами вестерн-блотингу. PT2 реагував з обома білками. Профілі зв'язування HT7 і AT8 описані вище. AT100 зв'язується з фосфорилованим Ser212/Thr214 і зв'язується з ПСФ-тау-білком, але не з тау-білком дикого типу. BT2 розпізнає нефосфорилований епітоп, що містить S199/S202 і, таким чином, розпізнає тау-білок дикого типу, але не ПСФ-тау-білок.

55 Конкурентне зв'язування з епітопами

Оцінювали конкурентне зв'язування моноклональних антитіл PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, AT8 ("ThermoScientific", Рокфорд, Іллінойс), AT100 ("ThermoScientific", Рокфорд, Іллінойс) і HT7 (MN1000) ("Thermo Scientific", Рокфорд, Іллінойс) із ПСФ-тау-білком або фосфорилованими тау-пептидами. Антитіла мітили за допомогою NHS-efipy MSD® Sulfo-Tag ("Meso Scale Discovery")

60 відповідно до інструкцій виробника.

Для конкуренції з міченими PT1, PT3, AT100 і HT7 збагачені ПСФ-тау-білки в кількості 5 мкл (50 мкг/мл) на ямку (очищені відповідно до описаного вище) наносили на планшет MSD HighBind ("Meso Scale Discovery", Гейтерсберг, Меріленд) на 2 години при кімнатній температурі. Для конкуренції з AT8, 25 мкл, 0,1 мг на ямку, синтетичного біотинільованого й пегільованого пептиду RSGYSSPG(pS)PG(pT)PGSRSR-OH ("New England Peptide, LLC.", Гарднер, Массачусетс) (SEQ ID NO:39), що відповідає залишкам 194-211 контрольного тау-білку, наносили на планшети, покриті стрептавідином ("Meso Scale Discovery", Гейтерсберг, Меріленд). Після нанесення ямки блокували за допомогою 150 мкл 5 % буфера MSD Blocker A при кімнатній температурі впродовж 2 годин і відмивали три рази 0,1 М буфера на основі ГЕПЕС, рН 7,4. У кожен ямку додавали 25 мкл суміші мічених окремих анти-тау-антитіл (10 нМ або 50 нМ) і послідовні розведення різних немічених конкурентних антитіл (від 1 нМ до 2 мкМ). Планшети інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі при обережному струшуванні й відмивали тричі, як описано вище. Додавали розведений буфер для зчитування MSD Read Buffer T у кількості 150 мкл на ямку, і дані планшетів зчитували за допомогою SECTOR Imager 6000 ("Meso Scale Discovery", Гейтерсберг, Меріленд).

Епітопи, анти-тау-мкАТ HT7, AT100 і AT8, що не перекриваються, описані вище. Базуючись на опублікованих даних, не очікували, що ці антитіла будуть конкурувати між собою за зв'язування з тау або пептидами.

Базуючись на проведених аналізах конкуренції, усі без виключення антитіла не конкурували одне з одним за зв'язування, що вказує, що вони зв'язуються з різними епітопами. У всіх без виключення експериментах помічено лише самоінгібування. На фігурах 1-5 показані результати аналізів конкуренції з міченими AT8, PT1, PT3, AT100 і HT7, відповідно.

#### Приклад 3

Анти-ПСФ-тау-антитіла знижують накопичення ПСФ-тау в умовах *in vivo*

5-місячним самицям мишей лінії P301L ("Taconic", кат#002508) вводили один раз на тиждень мишачий IgG1, фізіологічний розчин, PT3 (500 мкг/миша) або AT8 (експресований із гібридами ECACC, deposit number 9110086) упродовж 5 місяців. Мишей анестезували, перфузували охолодженим ЗФР, головний мозок вирізали на льоду. Одну півкулю головного мозку від кожної миші гомогенізували в 10 об'ємах буфера Н із подальшим центрифугуванням при 205,9 N (21000g) упродовж 20 хв. при температурі 4°C. Отриманий супернатант далі центрифугували при 205,9 N (100000 g) упродовж 60 хв. Після центрифугування осад (фракцію Р1) відновлювали й ресуспендували в лізисному буфері для проведення вестерн-блотингу й ІФА, як описано Chai et al. J Biol Chem 286:34457-67, 2011. Для проб кори головного мозку фракцію Р1 далі обробляли 1 % (маса/об'єм) N-лауроїлсаркозину й ультрацентрифугували для подальшого збагачення ПСФ-тау в осаді. Виявлено, що самці мишей лінії P301L мали низьку експресію трансгенів, та їх матеріал не використовували під час проведення аналізів.

Фосфорилований тау-білок вимірювали в гомогенатах стовбура головного мозку (фракція Р1) під час ІФА сендвіч-типу з використанням антитіл AT8 і AT100 як імобілізованих антитіл з подальшим детектування біотинільованого HT7 і авідину, кон'югованого з пероксидазою хрину (фігури 6А і 6В), і з AT100 у вестерн-блотинзі (фігура 6С), як це описано в істотній мірі в Chai et al. J Biol Chem 286:34457-67, 2011. Коротко, осад Р1 ресуспендували лізисним буфером ("Cell Signaling"). Проби залишку Р1 інкубували в ямках, заздалегідь покритих AT8 або AT100 ("Thermo Scientific"), із міченим біотином антитілом HT-7. Потім проби промивали 5 разів буферним розчином із подальшою інкубацією з авідином, кон'югованим пероксидазою хрину впродовж однієї години. Одразу після цього проби інкубували з однокомпонентним субстратом ТМБ ("Thermo Scientific") упродовж 30 хв. із подальшою обробкою 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Нарешті, реакцію зчитували з довжиною хвилі 450 нм і визначали вміст AT8- або AT100-реактивного тау-білка в головному мозку за допомогою стандартної кривої, побудованої за даними аналізу гомогенатів головного мозку людини, ураженої БА, і подавали графічно як відносну кількість гомогенату головного мозку, ураженого БА (нг/мл), що забезпечує такий самий сигнал ІФА, як і середні проби матеріалу нетрансгенної тварини (В6).

Статистично значуще зниження або тенденція до значущого зниження фосфорилованого тау помічені в трансгенних тварин із мутантним тау-білком Р301L, яким вводили PT3, порівняно з контрольними тваринами, яким вводили ізотипічний контроль, під час аналізів ІФА з використанням AT100 (p=0,057) або AT8 (p=0,0475) для детектування фосфорилювання (сигнал ІФА: група з введенням сольового розчину (1135±228,8); група з введенням IgG1(1344±245,6); група з введенням PT3(660,5±134,5); група з введенням AT8(1271±274)).

Для підтвердження даних, отриманих під час ІФА, гомогенати стовбура головного мозку (фракція Р1) тварин, яким вводили IgG1 або PT3, аналізували під час вестерн-блотингу за

допомогою виявлення ПСФ-тау з використанням антитіла AT100. Фільтри блотували за допомогою антитіла антиактин як завантажувального контролю (фігура 6B). Результати вестерн-блотингу показали зниження кількості ПСФ-тау, що виявляється антитілом AT100, порівняно з тваринами, якими вводили IgG1.

- 5 При аналізі кори головного мозку використовували як розчинні в саркозилі (що представляють розчинний тау-білок), так і нерозчинні (що представляють ПСФ-тау-білок) фракції кори головного мозку для проведення ІФА сендвіч-типу з використанням пан-тау-антитіла (PT4) або фосфо-тау-антитіла (AT8) для захоплення з подальшим використанням біотин-пан-тау-антитіла (hTau10) і потім авідину, кон'югованого з пероксидазою хрину. Тварини, яким вводили PT3, мали однаковий рівень загального вмісту тау порівняно з тваринами, яким вводили ізотипічний контроль IgG1. Тенденція до пониження рівня ПСФ-тау була очевидною у тварин, яким вводили PT3, порівняно з тваринами, яким вводили ізотипічний контроль при аналізі нерозчинних у N-лауроїлсаркозині фракцій (ІФА захоплення з PT4: група із введенням IgG: 851026±261198 і група із введенням PT3: 585639±120498; ІФА, захоплення з AT8: група із введенням IgG: 1125886±286240 (N=10) і група із введенням PT3: 746582±124970 (N=7)).

#### Приклад 4

Визначення характеристик анти-ПСФ-тау-антитіл

Визначення афінності

- 20 Взаємодію моноклональних антитіл PT1 і PT3 з рекомбінантним людським розчинним тау-білком або ПСФ-тау-білком вивчали за допомогою системи ProteOn. Усі взаємодії досліджували при температурі 25°C з використанням ЗФР, pH 7,4, із додаванням 3 мМ ЕДТК, і 0,005 % Твін-20 як рухомий або системний буфер. Використовували два різні експериментальні формати, один - для взаємодії з рекомбінантно експресованим контрольним тау-білком, й інший - для взаємодії з ПСФ-тау-білком. У цих експериментах як позитивний контроль використовували HT7 (Pierce, кат. № MN1000), мишаче анти-тау-антитіло.

- 25 Для дослідження взаємодії з рекомбінантно експресованим контрольним тау-білком готували поверхню біосенсора за допомогою нанесення специфічного антитіла (Ab) фрагмента Fcγ антілюдського або антимишачого IgG на поверхню ІС датчика GLC (ProteOn), дотримуючись усіх інструкцій виробника щодо хімії сполуки амінів (~5000 одиниць відповіді (RU)). Буфер з'єднання являв собою 10 мМ ацетату натрію, pH 4,5. Анти-ПСФ-тау-антитіла розводили в рухомому буфері й вводили для отримання захоплення, що становить 60-130 RU. Після захоплення анти-PSF-тау мкАТ слідувала ін'єкція рекомбінантно експресованого контрольного тау (Tau-441, каталог Sigma# T0576-50ug) у розчин (від 0,1 до 75 нМ у 5-кратних розведеннях). Асоціацію моніторували упродовж 2 хвилин (80 мкл ін'єктували при швидкості 40 мкл/хв.). Дисоціацію моніторували упродовж 10 хвилин. Регенерацію поверхні сенсора проводили за допомогою 0,85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> або 0,85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> з подальшим 50 мМ NaOH. Дані пропорційні в моделі зв'язування 1:1. Дані пропорційні в моделі зв'язування 1:1.

Таблиця 2

мкАТ	Антиген	$k_{\text{вкл.}} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{\text{викл.}} (s^{-1})$	*K <sub>D</sub> (нМ)
PT1	Контрольне тау	**		
PT1	ПСФ-тау	2,01E+05	6,47E-05	322
PT3	Контрольне тау	***		
PT3	ПСФ-тау	(1,23±0,06)E+06	(2,18±0,28)E-05	18±2

\* Для ПСФ-тау це є уявною внутрішньою афінністю, де K<sub>D</sub> отримана як співвідношення  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ , як похідне "підгонки", виконаної за допомогою бівалентної моделі зв'язування.

\*\* Значущі зв'язування відсутні

\*\*\* Зв'язування відсутні в 4 із 5 експериментів

- 40 Для дослідження взаємодії з ПСФ-тау-білком готували поверхню біосенсора за допомогою захоплення-з'єднання ПСФ-тау з використанням HT7 як реагенту захоплення. Потрібне додаткове приготування ПСФ-тау, відповідно до описаного вище, для системи ProteOn, щоб обмежити кількість нерозчинного матеріалу, що потрапляє в струминні елементи. ПСФ-тау-білок, відповідно до описаного вище, додатково готували за допомогою 2-кратного центрифугування за 49 N (5000 g), при температурі 5°C упродовж 10 хв., при цьому супернатант із другого центрифугування потім розводили в співвідношенні 1/20 або 1/40 в рухомому буфері. Для приготування ІС, ковалентно імобілізували HT7 на поверхні ІС сенсора GLC (ProteOn), дотримуючись усіх інструкцій виробника щодо хімії сполуки амінів (~3000 одиниць (RU)). Буфер



з'єднання представляв собою 10 мМ ацетату натрію, рН 4,5. Після іммобілізації НТ7 ПСФ-тау-білок ін'єктували й захоплювали (~300 RU) НТ7. Після захоплення ПСФ-тау-білок ковалентно іммобілізували на ІС сенсора шляхом активації ІС, дотримуючись усіх інструкцій виробника відносно хімії з'єднання амінів. Реакційноздатні ділянки, що залишилися, були остаточно  
 5 блоковані за допомогою ін'єкції етаноламіну. Після приготування й стабілізації поверхні, модифікованої ПСФ-тау-білком, і поверхні порівняння (яка не містить антигену), анти-ПСФ-тау-антитіла розводили в рухомому буфері й ін'єктували в розчин (0,1-75 нМ у 5-кратних розведеннях). Асоціацію моніторували впродовж 3 хвилин (120 мкл ін'єктували при швидкості 40 мкл/хв.). Дисоціацію моніторували впродовж 10 або 15 хвилин. Регенерацію поверхні сенсора  
 10 проводили за допомогою 10 мМ Gly, рН 2. Дані були пропорційні при використанні бівалентної моделі зв'язування, у якій уявну внутрішню афінність реєстрували як відношення  $k_{off-1}/k_{on-1}$ .

Базуючись на експериментах системи ProteOn, РТ1 зв'язував ПСФ-тау-білок з афінністю 322 пМ і не зв'язувався з контрольним тау-білком в умовах проведення випробувань (Таблиця 2). РТ3 зв'язував ПСФ-тау-білок з афінністю  $18 \pm 2$  пМ і не зв'язувався з контрольним тау-білком у 4  
 15 із 5 вимірювань в умовах проведення випробувань. Одне з вимірювань на системі 5 ProteOn показало слабке зв'язування, яке може бути використане для вимірювання афінності > використали 75 нМ, базуючись на максимальній концентрації контрольного тау.

Даний винахід розкритий у повному об'ємі, фахівцеві в даній галузі буде цілком зрозуміло, що в нього може бути внесена множина змін і модифікацій без відступу від суті й об'єму доданої  
 20 формули винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> "Janssen Biotech, Inc."

Christopher, Alderfer

Dariusz, Janecki

Xuesong, Liu

Marc, Mercken

Melissa, Murdock

Marc, Vandermeeren

Sam, Wu

<120> Анти-ПСФ-тау-антитіла та їх застосування

<130> CEN5316WOPCT

<150> 61/577817

<151> 2011-12-20

<160> 39

<170> Патент у версії 3.5

<210> 1

<211> 352

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val  
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro  
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg  
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly  
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser  
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro  
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys  
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met  
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu  
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val  
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His  
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp  
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr  
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr  
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val  
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser  
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu  
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
340 345 350

<210> 2

<211> 381

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly  
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala  
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys  
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala  
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala  
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro  
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr  
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg  
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu  
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln  
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser  
245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro  
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp  
275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro  
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu  
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser  
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser  
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
370 375 380

<210> 3  
<211> 410  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly

130	135	140	
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro			
145	150	155	160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro			
	165	170	175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly			
	180	185	190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser			
	195	200	205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys			
	210	215	220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys			
	225	230	235
			240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val			
	245	250	255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly			
	260	265	270
Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr			
	275	280	285
Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly			
	290	295	300
Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln			
	305	310	315
			320
Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly			
	325	330	335
Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys			

340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly  
370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu  
385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
405 410

<210> 4  
<211> 383  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val  
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro  
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg  
100 105 110



Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly  
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser  
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro  
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys  
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met  
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu  
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu  
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys  
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp  
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His  
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe  
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His  
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe  
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr  
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn  
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala  
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
370 375 380

<210> 5

<211> 441

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 435 440

<210> 6

<211> 441

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
435 440

<210> 7

<211> 5

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Ser Trp Met Gly  
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Gly

<210> 9

<211> 10

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 9

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Phe Ala Asn  
1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ser Ser Glu Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 11

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Gln Tyr Leu Glu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 16

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 14

Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 10

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> Білок

<213> Mus musculus



<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 17

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp  
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 18

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr  
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser  
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 20

Leu Pro Gly Ser Gly Gly  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> Білок  
<213> Mus musculus

<400> 21

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Phe Ala  
1 5

<210> 22  
<211> 12  
<212> Білок  
<213> Mus musculus

<400> 22

Ser Glu Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

<210> 23  
<211> 3  
<212> Білок  
<213> Mus musculus

<400> 23

Arg Met Ser  
1

<210> 24  
<211> 6  
<212> Білок  
<213> Mus musculus

<400> 24

Tyr Leu Glu Tyr Pro Leu  
1 5

<210> 25  
<211> 7  
<212> Білок  
<213> Mus musculus

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 26  
 <211> 5  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 26

Ser Lys Gly Gly Asn  
 1 5

<210> 27  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 27

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala  
 1 5

<210> 28  
 <211> 7  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 28

Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr  
 1 5

<210> 29  
 <211> 3  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 29

Arg Ala Asn  
 1

<210> 30  
 <211> 6  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 30

Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

1 5

<210> 31

<211> 357

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 31

caggttcagc tgcagcagtc tggaaactgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60

tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctcctgga tgggggtgggt taagcagagg 120

cctggacatg gccttgagtg gattggagac attttacctg gaagtgggtg tactaactac 180

aatgagaggt tcaagggcaa ggcctcattc actgcagaaa catcctccaa cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgt aagaagctac 300

tatgattacg accgctttgc taactggggc caagggactc tggctactgt ctctgca 357

<210> 32

<211> 336

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 32

gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtttcc 60

atctctgca ggtctagtga gagtctcctg catagtaatg gcaaacactta cttgtattgg 120

ttctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatat atcggtatgc caacctgcc 180

tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaatatct agaatatccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 33

<211> 354

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 33

gaagtgaagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagaat 120

ccagagaaga ggctggagtg ggctgcatcc attagtaagg gtggtaacac ctactatcca 180  
 aacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctgtacctg 240  
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccctttatt actgtgcaag aggctggggg 300  
 gattacgggt gggttgctta ctggggccaa gtgactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 34  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<400> 34  
 gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60  
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aggtatttaa actggtcca gcagaaacca 120  
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tgctagatgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tactctctca ccatcagcag cctggattat 240  
 gaagatatgg gaattatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggatg 300  
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 35  
 <211> 119  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 35

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Ser Phe Thr Ala Glu Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65            70            75            80

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

Val Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly  
                    100                      105                      110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
                    115

<210> 36

<211> 112

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 36

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Ser Leu Leu His Ser  
                    20                      25                      30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                    35                      40                      45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
                    50                      55                      60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr  
                    85                      90                      95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                    100                      105                      110

<210> 37

<211> 118

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 37

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 38

<211> 107

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 38

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr  
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

<210> 39

<211> 18

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> фосфорилизованого тау-пептиду, що відповідає залишкам 194-211  
контрольного тау-білка

<220>

<221> Фосфорилювання

<222> (9)..(9)

<220>

<221> Фосфорилювання

<222> (12)..(12)

<400> 39

Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Arg

1



## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло, яке зв'язує парний спіральний філамент-тау (ПСФ-тау), що містить ділянку важкого ланцюга, яка визначає комплементарність (HCDR) 1, ділянку важкого ланцюга, яка визначає комплементарність (HCDR) 2 і ділянку важкого ланцюга, яка визначає комплементарність (HCDR) 3 варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) з SEQ ID NO:37, і ділянку легкого ланцюга, яка визначає комплементарність (LCDR) 1, ділянку легкого ланцюга, яка визначає комплементарність (LCDR) 2 і ділянку легкого ланцюга, яка визначає комплементарність (LCDR) 3 варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) з SEQ ID NO:38.
2. Виділене антитіло за п. 1, у якому HCDR1, HCDR2 і HCDR3 містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO:13, 14 і 15, відповідно, і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO:16, 17 і 18, відповідно.
3. Виділене антитіло за п. 1, у якому HCDR1, HCDR2 і HCDR3 містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO:25, 26 і 27, відповідно, і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO:28, 29 і 30, відповідно.
4. Виділене антитіло за п. 3, яке містить VH з SEQ ID NO:37 і VL з SEQ ID NO:38.
5. Виділене антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим.
6. Виділене антитіло за п. 2, яке **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим.
7. Виділене антитіло за п. 3, яке **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим.
8. Виділене антитіло за п. 4, яке **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим.
9. Вектор, який містить полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг антитіла, яке містить VH антитіла за п. 2, і полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг антитіла, яке містить VL антитіла за п. 2.
10. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 9 для застосування в експресії антитіла за п. 2.
11. Клітина-хазяїн, яка містить полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг антитіла, яке містить VH антитіла за п. 2, і полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг антитіла, яке містить VL антитіла за п. 2.
12. Спосіб отримання антитіла, яке зв'язує ПСФ-тау, що включає стадії, на яких культивують клітину-хазяїна, яка містить перший вектор експресії VH антитіла за п. 1 і другий вектор експресії VL антитіла за п. 1, і відновлюють антитіло, що продукується клітиною-хазяїном.
13. Спосіб за п. 12, в якому клітиною-хазяїном є клітина-хазяїн за п. 10 або 11.
14. Виділене антитіло за будь-яким з пп. 1, 2 або 3, яке відрізняється тим, що ізотипом антитіла є IgG1.
15. Виділене антитіло за будь-яким з пп. 1, 2 або 3, яке відрізняється тим, що ізотипом антитіла є IgG2.
16. Виділене антитіло за будь-яким з пп. 1, 2 або 3, яке відрізняється тим, що ізотипом антитіла є IgG4.
17. Фармацевтична композиція для зменшення агрегації тау в парних спіральних філаментах (ПСФ-тау), яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1, 2 або 3 і фармацевтично прийнятний носій.

Конкуренція міченого AT8 і різних мкАТ

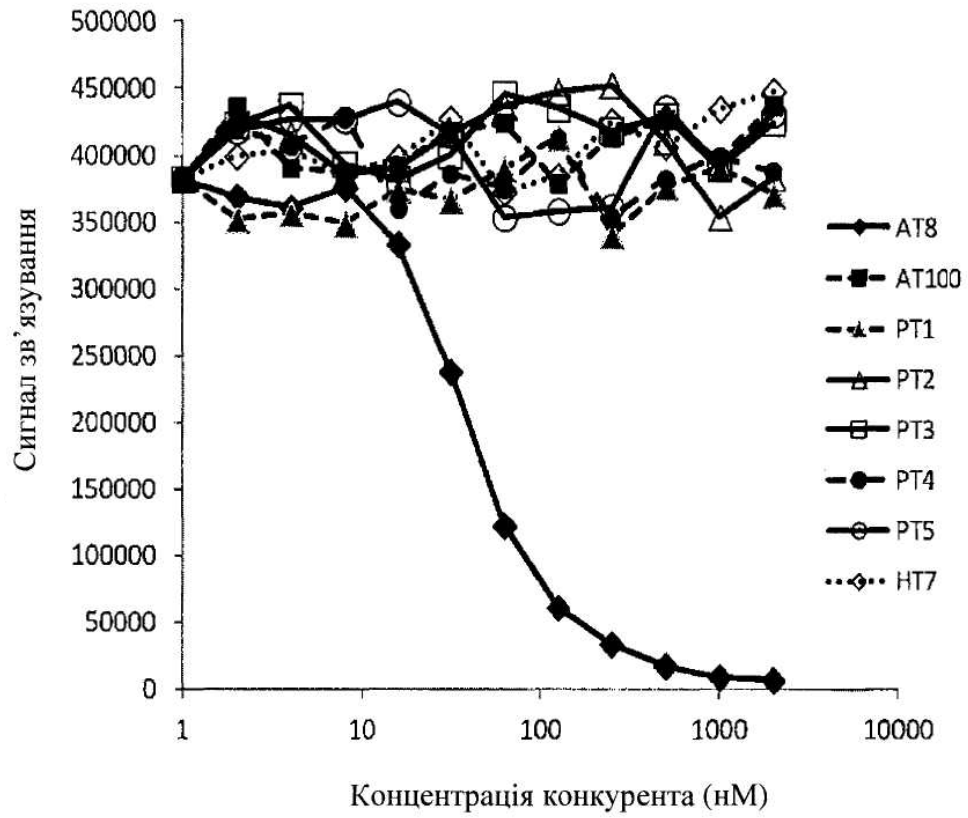


Fig. 1

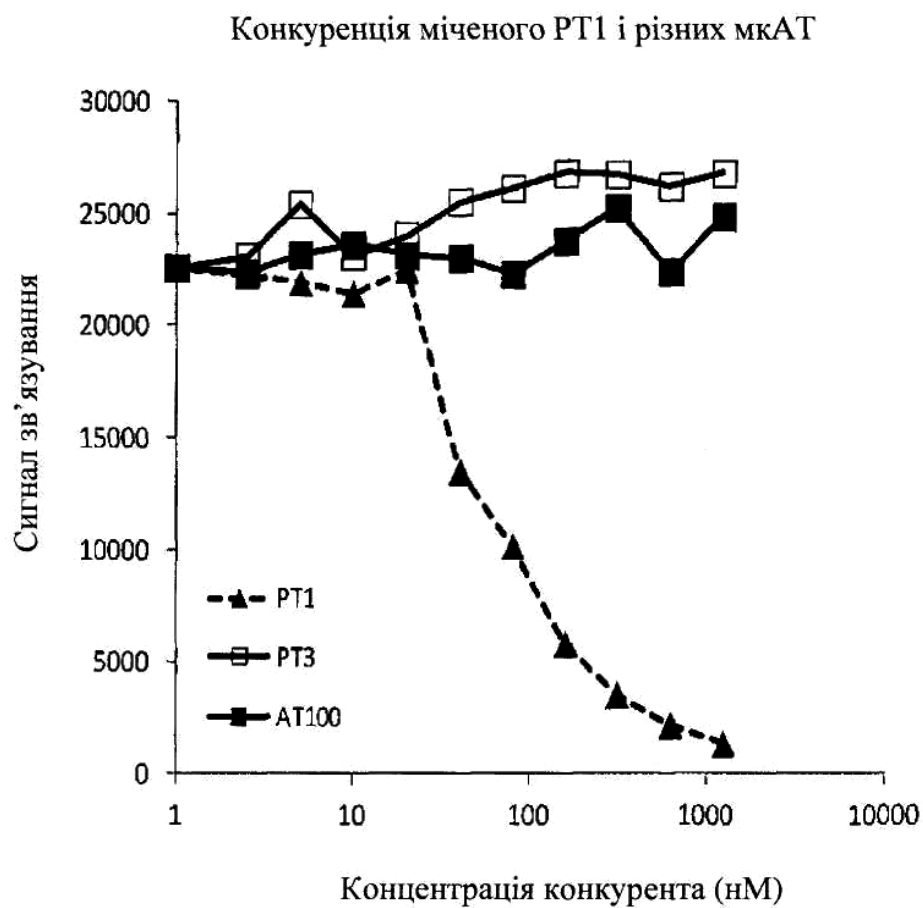
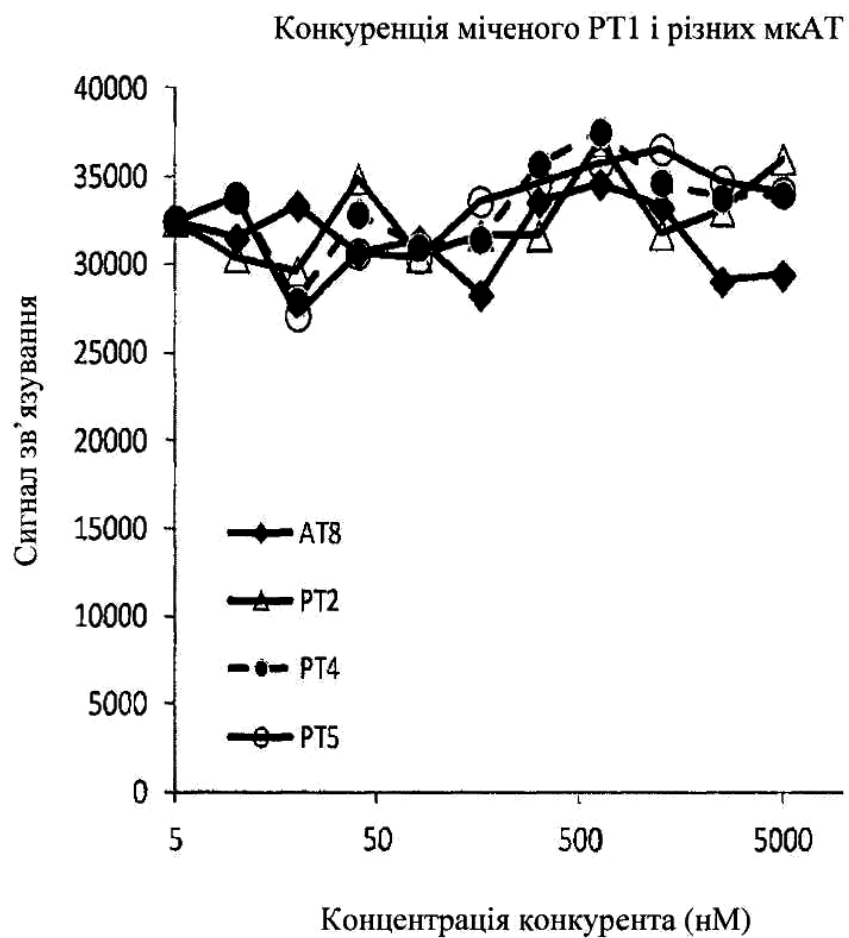
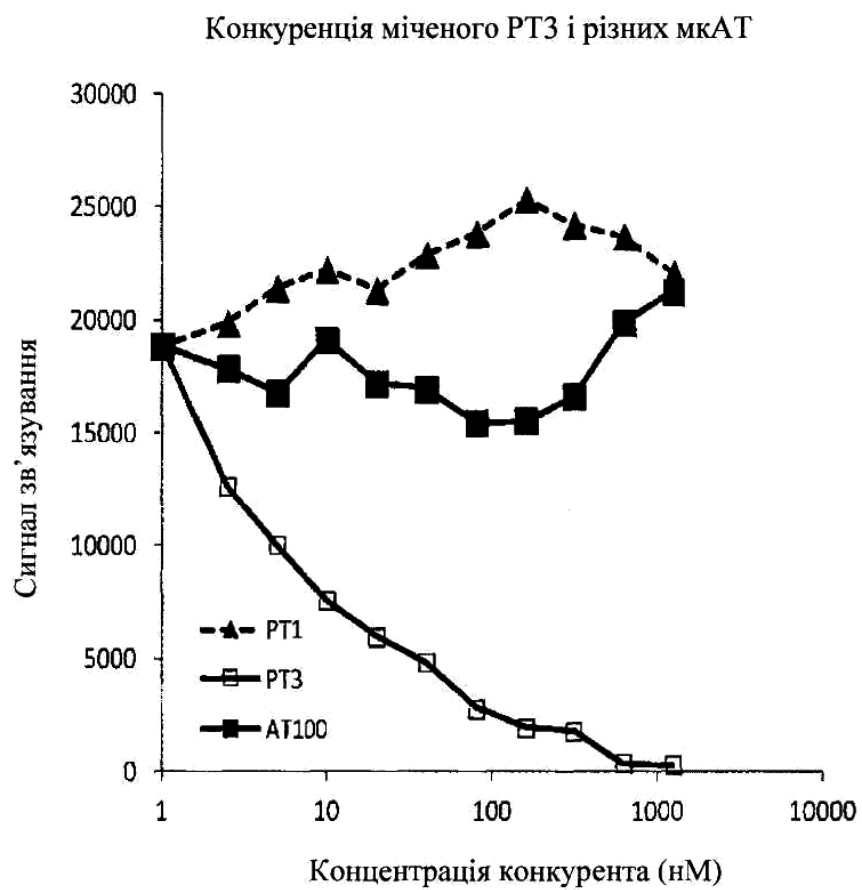


Fig. 2A

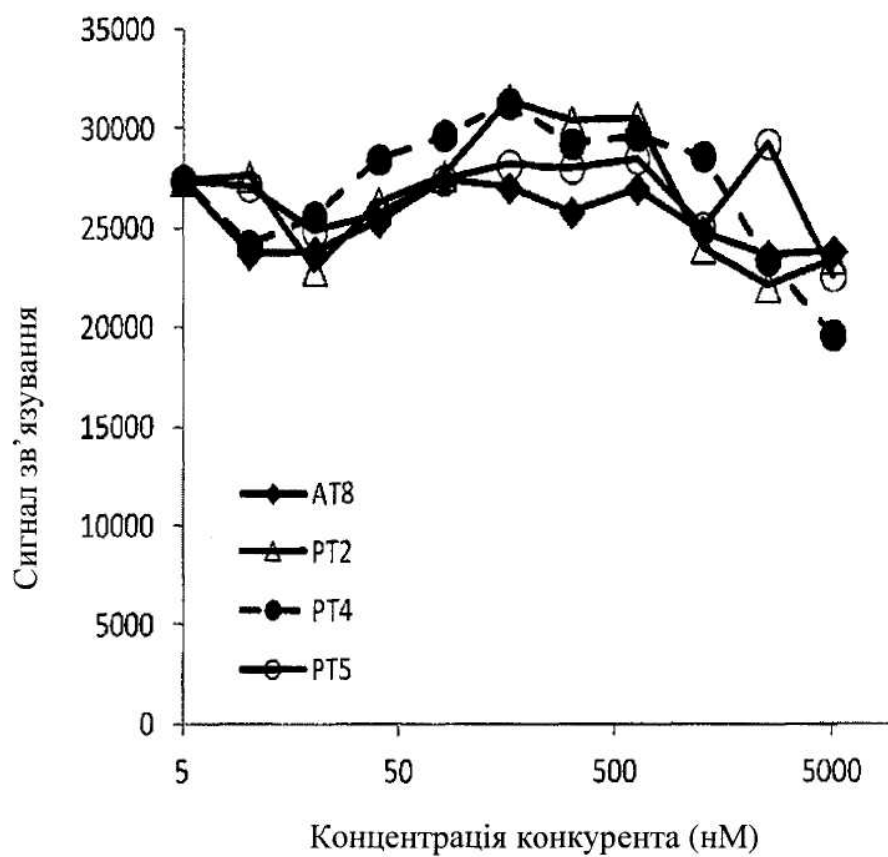


Фіг. 2В



Фіг. 3А

Конкуренція міченого РТ3 і різних мкАТ



Фіг. 3В

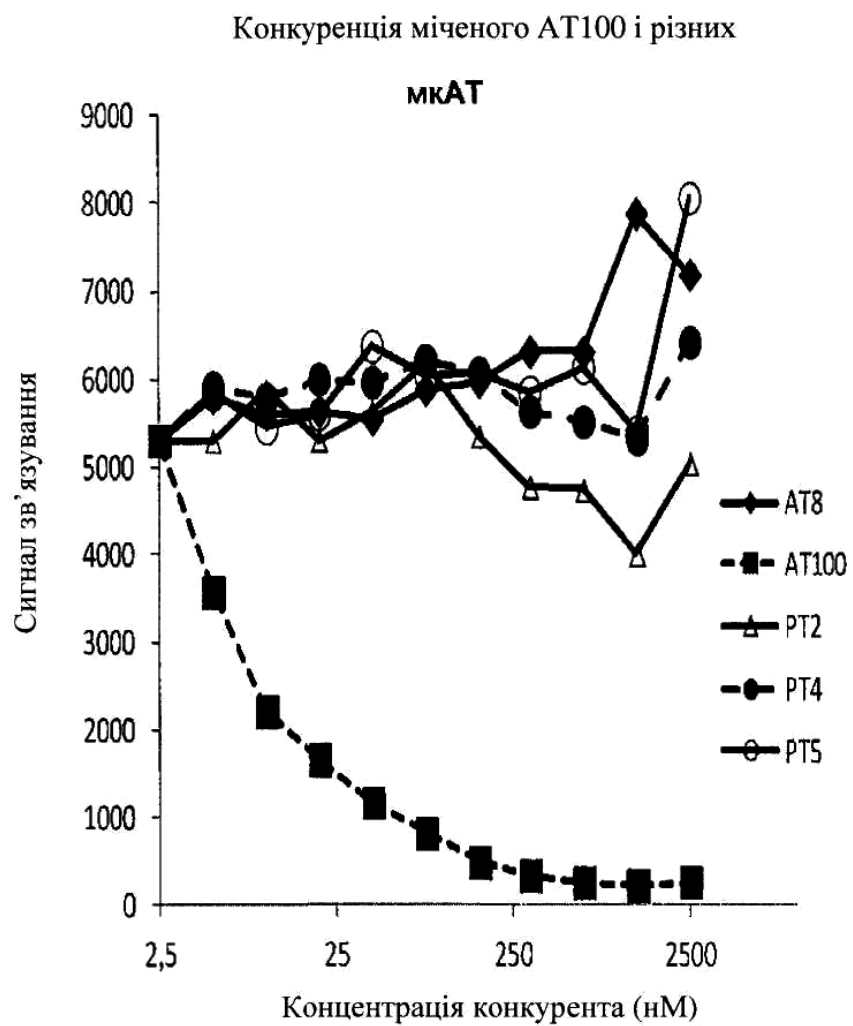
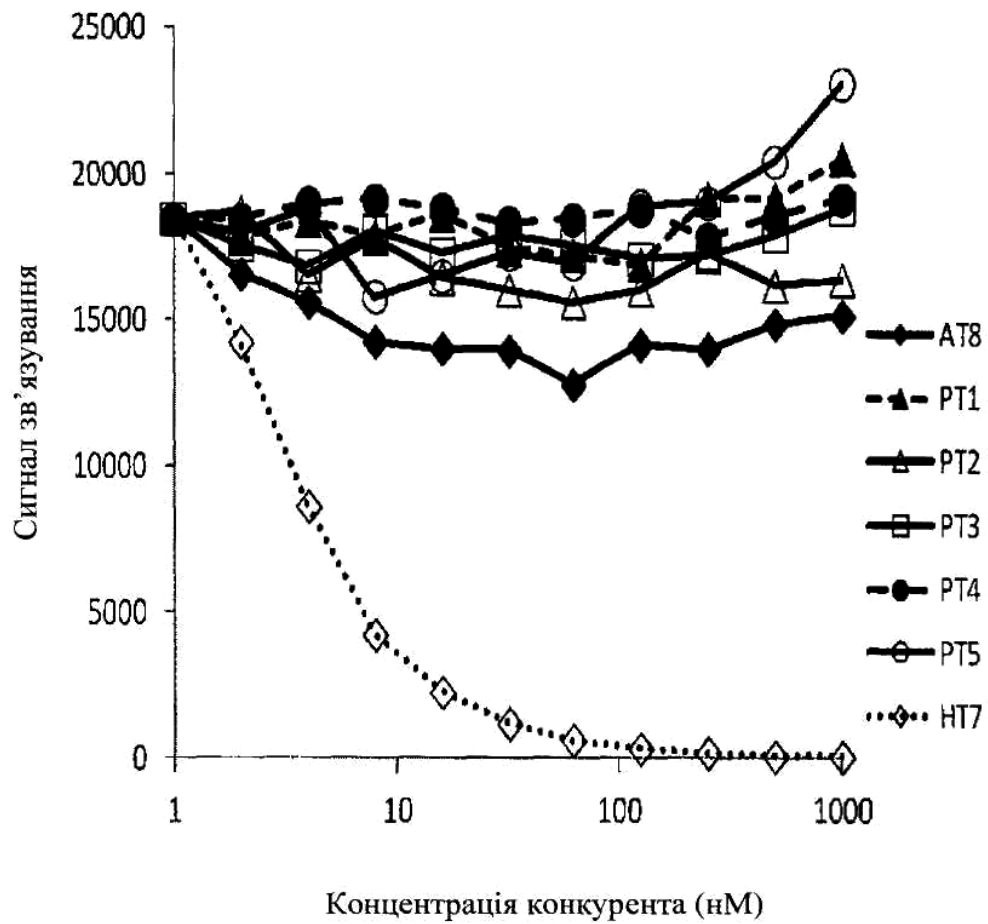
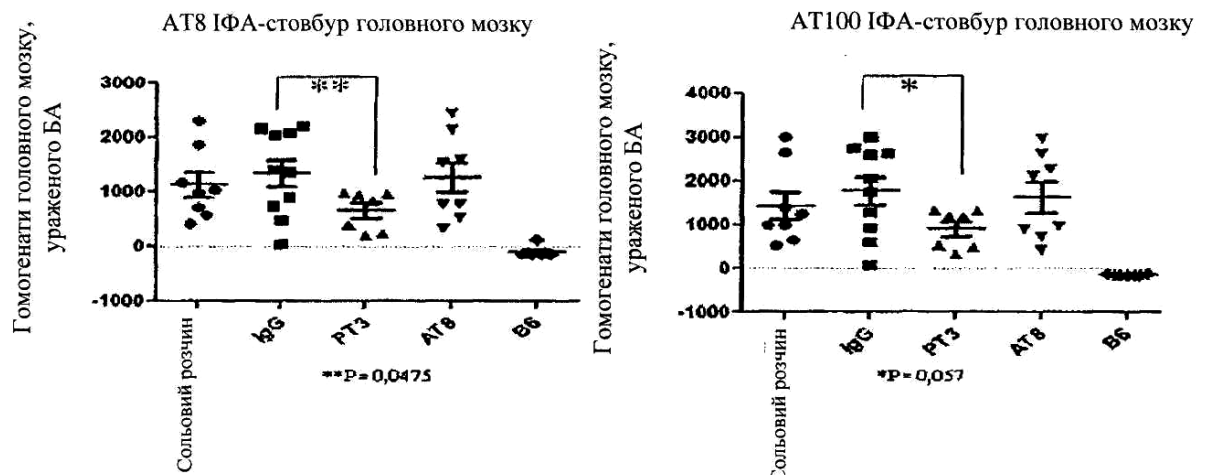


Fig. 4

# Конкуренція міченого НТ7 і різних мкАТ

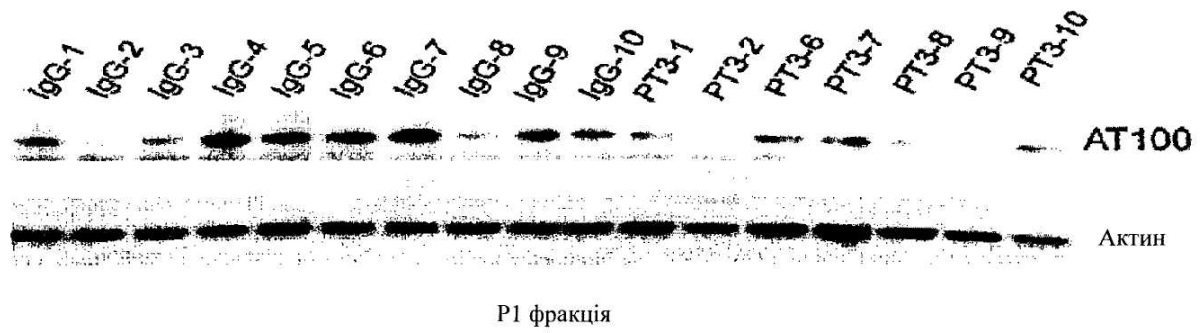


Фиг. 5

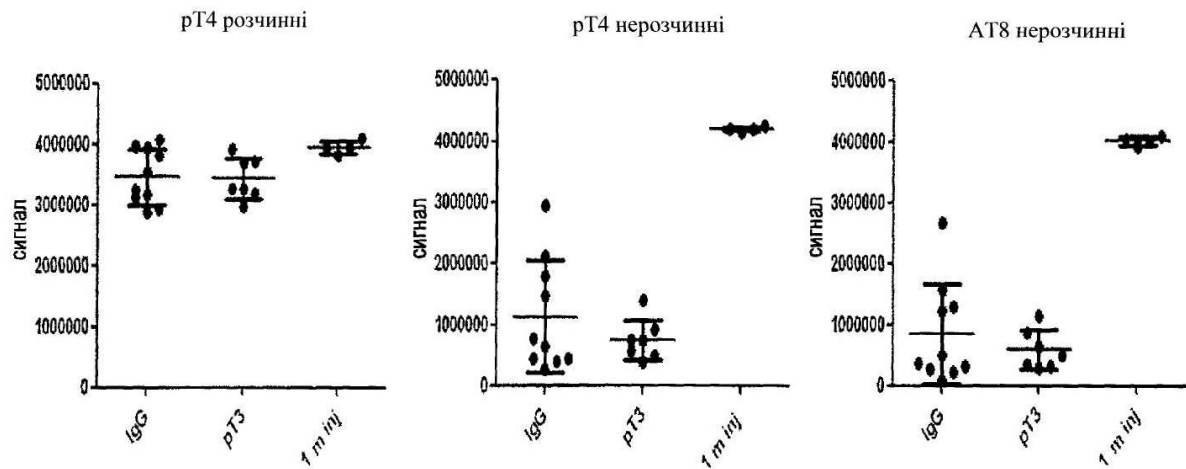


Фиг. 6A





Фіг. 6В



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601