

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047253**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.25

(21) Номер заявки
202290308

(22) Дата подачи заявки
2020.07.13

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

(54) **АНТИТЕЛО К ТАУ-БЕЛКУ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **10-2019-0085233**

(32) **2019.07.15**

(33) **KR**

(43) **2022.04.06**

(86) **PCT/KR2020/009207**

(87) **WO 2021/010712 2021.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДЕЛ, ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
Ёон Сын-Ён (KR)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **KR-A-10-20180072579**
NCBI. GenBank Accession No. ACJ05297.1.
immunoglobulin heavy chain variable region, partial
[Mus musculus]. 26 July 2016. See entire document.
NCBI. GenBank Accession No. ABK41140.1.
immunoglobulin light chain variable, partial [Mus
musculus]. 14 July 2016. See entire document.
US-A1-20130251731
KR-A-1020170106458
KR-A-1020150003274

(57) Настоящее изобретение относится к антителу к тау-белку, которое специфически связывается с тау-белком, и его применению. Антитело к тау-белку по настоящему изобретению специфически связывается с тау-белком, в котором лизин в положении 280 является ацетилированным, и оно может подавлять агрегацию аномальных тау-белков. Кроме того, антитело к тау-белку по настоящему изобретению при введении животной модели индуцированной деменции может улучшать двигательную активность и когнитивную способность у животной модели. Следовательно, антитело к тау-белку по настоящему изобретению можно использовать в предупреждении или лечении нейродегенеративных заболеваний.

B1

047253

047253

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу к тау-белку, которое специфически связывается с тау-белком, и его применению.

Уровень техники

Болезнь Альцгеймера, на долю которой приходится приблизительно 50% ранних форм деменции, представляет собой дегенеративное заболевание, поражающее черепные нервы, с повышенной частотой возникновения после возраста 65 лет, и оно демонстрирует быстрый рост во всем мире по мере старения населения.

Полагали, что причина возникновения болезни Альцгеймера в основном связана с накоплением β -амилоида, гиперфосфорилированием тау-белка или повышенной продукцией β -амилоида, вызванной пресенилином-1. Среди них токсичность для нервных клеток, вызванная накоплением β -амилоида, считалась основной причиной возникновения деменции при болезни Альцгеймера (Hardy AJ et al., Science, 256, 184-185, 1992). Однако, поскольку испытание фазы III для соланезумаба, который был новым лекарственным препаратом-кандидатом для лечения болезни Альцгеймера от "Илай Лилли энд Компани" (Eli Lilly and Company), потерпело неудачу, было обнаружено, что токсичность для нервных клеток, вызванная накоплением β -амилоида, не является ощутимой. Следовательно, сосредоточились на той идее, что аномальное гиперфосфорилирование тау-белка действует как основная причина возникновения болезни Альцгеймера.

Тау-белок представляет собой белок, который стабилизирует микротрубочку, которая представляет собой белок, транспортирующий клеточный материал. В организме человека тау-белок существует в шести изоформах и широко распространен в нейронах центральной нервной системы. Кроме того, в случае наличия мутации в тау-белке, известно, что тау-белок гиперфосфорилируется, что обеспечивает аномальное накопление нейрофибриллярных клубков (NFT) в нервных клетках, тем самым вызывая дегенеративное неврологическое заболевание, такое как деменция и болезнь Паркинсона (Dong Hee Choi et al., Brain & NeuroRehabilitation, 4, 21-29, 2011).

Однако в тау-белке человека, состоящем из 441 аминокислоты, имеется множество мест, в которых может происходить посттрансляционная модификация, что затрудняет обнаружение в тау-белке участка-мишени, проявляющего профилактическое или терапевтическое действие на деменцию. Вследствие таких разнообразных модификаций также имеются трудности в разработке терапевтического средства.

Сущность изобретения

Техническая задача

Соответственно, авторы настоящего изобретения занимались разработкой эффективного терапевтического средства для дегенеративного неврологического заболевания. В итоге авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитело, которое специфически связывается с фрагментом тау-белка, в котором ацетилирован лизин в положении 280, снижает агрегацию тау-белков. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что в экспериментах с использованием животной модели индуцированной деменции, у животной модели, которой было введено антитело, проявляется улучшенная двигательная функция и когнитивная функция.

Решение задачи

Для решения вышеуказанных задач в аспекте настоящего изобретения предусмотрено антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат: (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, который кодирует антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, или вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела к тау-белку.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена клетка-хозяин, в которую введен вектор экспрессии.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, причем способ включает стадию культивирования клетки-хозяина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена гибридома с номером доступа KCTC 14155BP.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания, причем фармацевтическая композиция содержит в качестве активного ингредиента антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена композиция для диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем композиция содержит антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для предупреждения, лечения или диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, вектор экспрессии или клетку-хозяина.

Полезные эффекты изобретения

Антитело к тау-белку по настоящему изобретению может специфически связываться с тау-белком, в котором ацетилирован лизин в положении 280, и подавлять агрегацию аномальных тау-белков. Кроме того, в случае введения антитела к тау-белку по настоящему изобретению животной модели индуцированной деменции, антитело к тау-белку может улучшать двигательную функцию и когнитивную функцию у животной модели. Соответственно, антитело к тау-белку по настоящему изобретению можно преимущественно применять для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 схематически проиллюстрирован фрагмент тау-белка K280-ас, полученный в варианте осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2 представлено схематическое изображение вектора экспрессии pET-21b-тау (K18), применяемого в варианте осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 3 проиллюстрирован результат теста на основе вестерн-блоттинга, проведенного для определения связывания между антителом и белковым фрагментом K280-ас, чтобы выбрать моноклональное антитело, которое специфически связывается с белковым фрагментом K280-ас.

На фиг. 4 проиллюстрирован результат теста на основе ELISA, проведенного для определения связывания между антителом и белковым фрагментом K280-ас, чтобы выбрать моноклональное антитело, которое специфически связывается с белковым фрагментом K280-ас.

На фиг. 5 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения того, связывается ли выбранное антитело ADEL-Y01 с ацетилированным тау-белком дикого типа (Тау) и тау-белком (Тау K280A), в котором аминокислота лизин в положении 280 заменена аланином.

На фиг. 6 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения того, связываются ли специфически ацетилированный белок дикого типа и неацетилированный тау-белок дикого типа с антителом ADEL-Y01h_v01.

На фиг. 7 проиллюстрированы значения константы диссоциации (Kd), измеренные с использованием системы Octet® K2 для определения аффинности между антителом ADEL-Y01m и белковым фрагментом K280-ас.

На фиг. 8 проиллюстрирован результат теста на основе ELISA, проведенного для определения связывания между антителами ADEL-Y01h (v01-v12) и белковым фрагментом K280-ас.

На фиг. 9 проиллюстрированы уровни и паттерны экспрессии тау-белка (Тау5) и ацетилированного тау-белка (Тау-асK208) в тканях головного мозга здоровых мышей (дикий тип) и мышей с деменцией (Тау P301L) в возрасте 4 месяца или 12 месяцев.

На фиг. 10 проиллюстрирована схема эксперимента для определения эффекта улучшения поведения, достигаемого после интрацеребровентрикулярного введения антитела ADEL-Y01m с использованием мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 11 проиллюстрирован результат теста на построение гнезда (**p<0,001), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 12 проиллюстрирован результат теста с Y-образным лабиринтом (*p<0,05), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 13 проиллюстрирован результат теста с водным лабиринтом, в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 14 проиллюстрировано время пребывания в каждой зоне в тесте с водным лабиринтом (**p<0,01), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 15 проиллюстрирован результат теста на силу захвата (*p<0,05, **p<0,01), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 16 проиллюстрирована схема эксперимента для определения эффекта улучшения поведения, достигаемого после внутрибрюшинного введения антитела ADEL-Y01m с использованием мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 17 проиллюстрирован результат теста на построение гнезда (*p<0,05, **p<0,01), в котором антитело ADEL-Y01m вводили внутрибрюшинно мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 18 проиллюстрирован результат теста с Y-образным лабиринтом (*p<0,05), в котором анти-

тело ADEL-Y01m вводили внутрибрюшинно мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 19 проиллюстрирован результат теста с водным лабиринтом, в котором антитело ADEL-Y01m вводили внутрибрюшинно мышинной модели индуцированной деменции.

На фиг. 20 проиллюстрировано время пребывания в каждой зоне в тесте с водным лабиринтом (* $p < 0,05$), в котором антитело ADEL-Y01m вводили внутрибрюшинно мышинной модели индуцированной деменции перед проведением теста с водным лабиринтом.

На фиг. 21 проиллюстрирован результат тестов на основе иммунопреципитации и вестерн-блоттинга, проведенных для определения связывания между антителом ADEL-Y01m и ацетилированным тау-белком (Tau-acK280), экспрессированным в коре головного мозга и тканях гиппокампа здоровых мышей (дикий тип) или мышинной модели индуцированной деменции (Tau P301L).

На фиг. 22 проиллюстрированы фотографии, сделанные после того, как ткани головного мозга здоровых пожилых людей и ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера подвергли иммуногистохимическому окрашиванию с использованием антитела ADEL-Y01m.

На фиг. 23 А проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения уровней экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) и β -амилоида в тканях головного мозга здоровых пожилых людей или тканей головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера.

На фиг. 23B проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения связывания между антителом ADEL-Y01m и ацетилированным тау-белком, экспрессированным в тканях головного мозга здоровых пожилых людей или тканях головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (* $p < 0,05$).

На фиг. 24 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения уровней экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) и фосфорилированного тау-белка (pSer396) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 25 проиллюстрированы уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

На фиг. 26 проиллюстрированы уровни экспрессии фосфорилированного тау-белка (pSer396) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m (** $p < 0,01$).

На фиг. 27 проиллюстрированы уровни экспрессии ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 28 проиллюстрированы фотографии, показывающие ткани головного мозга, подвергнутые иммунному окрашиванию антителом ADEL-Y01m, где ткани головного мозга получены от здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции (Tau-P301L-ADEL-Y01m), которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 29 проиллюстрированы уровни экспрессии AT8 и фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции (Tau-P301L-ADEL-Y01m), которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 30 проиллюстрированы уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) и фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции (Tau-P301L-ADEL-Y01m), которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 31 проиллюстрированы уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 32 проиллюстрированы уровни экспрессии ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 33 проиллюстрированы уровни экспрессии фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 34 проиллюстрированы уровни экспрессии синаптических белков (PSD95 и синапсин-1) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 35 проиллюстрированы уровни экспрессии PSD95 в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции, мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 36 проиллюстрированы уровни экспрессии синапсина-1 в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции, мышинной модели индуцированной деменции, которой интрацеребровентрикулярно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 37 проиллюстрированы уровни экспрессии синаптических белков (PSD95 и синапсин-1) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 38 проиллюстрированы уровни экспрессии PSD95 в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 39 проиллюстрированы уровни экспрессии синапсина-1 в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 40 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения того, проникает ли антитело ADEL-Y01m в ткани головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной деменции и мышинной модели индуцированной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m, и связывается ли антитело с тау-белком.

На фиг. 41 проиллюстрирована схема эксперимента для определения эффекта улучшения поведения, достигаемого после интрацеребровентрикулярного введения антитела ADEL-Y01m с использованием мышинной модели индуцированной возрастной деменции.

На фиг. 42 проиллюстрирован результат теста на построение гнезда (* $p < 0,05$), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной возрастной деменции.

На фиг. 43 проиллюстрирован результат теста с Y-образным лабиринтом (* $p < 0,05$), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной возрастной деменции.

На фиг. 44 проиллюстрировано время пребывания в каждой зоне в тесте с водным лабиринтом (* $p < 0,05$), в котором антитело ADEL-Y01m интрацеребровентрикулярно вводили мышинной модели индуцированной возрастной деменции.

На фиг. 45 проиллюстрированы уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилованного тау-белка (Tau-acK280) и фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной возрастной деменции и мышинной модели индуцированной возрастной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 46 проиллюстрированы уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной возрастной деменции и мышинной модели индуцированной возрастной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

На фиг. 47 проиллюстрированы уровни экспрессии ацетилованного тау-белка (Tau-acK280) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной возрастной деменции и мышинной модели индуцированной возрастной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (** $p < 0,01$).

На фиг. 48 проиллюстрированы уровни экспрессии полного фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной возрастной деменции и мышинной модели индуцированной возрастной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m (* $p < 0,05$).

На фиг. 49 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения каждой фракции нерастворимых агрегатов тау-белка в коре головного мозга здоровых мышей, мышинной модели индуцированной возрастной деменции и мышинной модели индуцированной возрастной деменции, которой внутрибрюшинно вводили антитело ADEL-Y01m.

На фиг. 50 проиллюстрированы уровни экспрессии гемагглютинина (HA), полного тау-белка (Tau5) и ацетилованного тау-белка (Tau-acK280), которые определяли с помощью теста на основе вестерн-блоттинга, проведенного после осуществления лизиса донорских клеток, обработанных ацетилованным тау-белком.

На фиг. 51 проиллюстрированы уровни экспрессии гемагглютинина (HA), полного тау-белка (Tau5) и ацетилованного тау-белка (Tau-acK280), которые определяли с помощью теста на основе вестерн-блоттинга, проведенного после получения сред из донорских клеток, обработанных ацетилованным тау-белком.

На фиг. 52 проиллюстрированы внутриклеточные агрегаты тау-белка, определенные с помощью теста на основе вестерн-блоттинга, проведенного после нанесения культуры донорских клеток, обработанных ацетилованным тау-белком, на нервные клетки и осуществления лизиса нервных клеток через 1 ч или 20 ч.

На фиг. 53 проиллюстрированы внутриклеточные агрегаты тау-белка, определенные с помощью теста на основе вестерн-блоттинга и теста на основе иммунопреципитации после нанесения культуры до-

норских клеток, обработанных ацелилированным тау-белком, на нервные клетки и осуществления лизиса нервных клеток через 1 ч или 20 ч.

На фиг. 54 проиллюстрирован эффект ингибирования затравочного действия тау-белка (**p<0,01, ***p<0,001), определенный с помощью FRET, проведенного после обработки FRET-биосенсорных клеток Тау-RD-P301S белковым фрагментом K280-ас или его агрегатом и антителом ADEL-Y01h01_v01.

На фиг. 55 проиллюстрирован эффект ингибирования затравочного действия тау-белка (**p<0,01), определенный с помощью резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), проведенного после обработки FRET-биосенсорных клеток Тау-RD-P301S нерастворимой в саркозиле фракцией от пациентов с болезнью Альцгеймера и антителом ADEL-Y01h01_v01.

На фиг. 56 проиллюстрированы фотографии, показывающие ткани головного мозга, подвергнутые иммунному окрашиванию антителом к АТ8, где ткани головного мозга извлекали после введения нерастворимой в саркозиле фракции от пациентов с болезнью Альцгеймера в слой СА1 левого гиппокампа мышей с деменцией Тау-P301L (Ipsi: ипсилатеральный, Contra: контралатеральный).

На фиг. 57 проиллюстрированы фотографии, показывающие ткани головного мозга, подвергнутые иммунному окрашиванию антителом к АТ8, где ткани головного мозга извлекали после введения нерастворимой в саркозиле фракции от пациентов с болезнью Альцгеймера в слой СА1 левого гиппокампа мышей с деменцией Тау-P301L (DG: зубчатая извилина, ЕС: энторинальная кора).

На фиг. 58 и 59 представлены графики, показывающие степень иммунного окрашивания тканей головного мозга антителом к АТ8, где ткани головного мозга извлекали после введения нерастворимой в саркозиле фракции от пациентов с болезнью Альцгеймера в слой СА1 левого гиппокампа мышей с деменцией Тау-P301L (*p<0,05, **p<0,01).

На фиг. 60 проиллюстрирован результат теста на основе тιοфлавина-Т, проведенного для определения изменений в агрегации ацелилированных тау-белков после обработки ацелилированного тау-белка IgG или антителом ADEL-Y01m.

На фиг. 61 проиллюстрирован результат теста, проведенного для определения изменений количества агрегированных ацелилированных тау-белков (Тау-асK280) после обработки тау-белка (K18), ацелилированного тау-белка (K18 + P300) и агрегированного ацелилированного тау-белка (K18 + P300 + гепарин) антителом ADEL-Y01m.

На фиг. 62 представлен график, показывающий активность лактатдегидрогеназы (LDH), которая содержится в супернатанте, полученном после того, как полученные из мыши нервные клетки, обработанные IgG или антителом ADEL-Y01m, обрабатывали агрегатами ацелилированного тау-белка (***p<0,001).

На фиг. 63 представлен график, показывающий жизнеспособность нервных клеток, полученных после того, как полученные из мыши нервные клетки, обработанные IgG или антителом ADEL-Y01m, обрабатывали агрегатами ацелилированного тау-белка (*p<0,05, ***p<0,001).

На фиг. 64 представлены графики, показывающие флуоресценцию HiLyte™ Fluor 488 в микроглии, полученной после того, как полученную из мыши микроглию, обработанную IgG или антителом ADEL-Y01m, обрабатывали агрегатами ацелилированного тау-белка, меченными HiLyte™ Fluor 488.

Подробное описание изобретения

Далее в данном документе настоящее изобретение будет описано подробно.

В аспекте настоящего изобретения предусмотрено антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

Используемый в данном документе термин "антитело" означает иммунный белок, который может связываться с антигеном, за счет чего препятствует действию антигена или устраняет антиген. Существует пять типов антител: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, и эти антитела содержат тяжелые цепи, продуцируемые генами константной области тяжелой цепи, μ , δ , γ , α и ϵ , соответственно. В методиках с использованием антител в основном используют IgG. IgG имеет четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и их структурные и функциональные характеристики могут отличаться.

IgG образует Y-образную стабильную структуру (молекулярная масса: приблизительно 150 кДа), составленную из двух белков тяжелой цепи (приблизительно 50 кДа) и двух белков легкой цепи (приблизительно 25 кДа). В антителах легкая и тяжелая цепи состоят из вариабельной области, аминокислотная последовательность которой у разных антител отличается, и константной области, аминокислотная последовательность которой одинакова среди антител. В константной области тяжелой цепи имеются домены СН1, Н (шарнир), СН2 и СН3. Каждый из доменов состоит из двух β -складчатых структур, и доме-

ны соединены друг с другом посредством внутримолекулярной дисульфидной связи. Две переменные области тяжелой и легкой цепей объединяются с образованием антигенсвязывающего сайта. Антигенсвязывающий сайт имеется на каждом из двух плеч Y-образной формы. Участок, способный связываться с антигеном, называется Fab (связывающий фрагмент антитела), а участок, который не связывается с антигеном, называется Fc (кристаллизуемый фрагмент). Fab и Fc соединены друг с другом посредством гибкой шарнирной области.

Используемый в данном документе термин "CDR" означает гиперпеременную область, которая представляет собой сайт, находящийся в переменных областях тяжелой цепи и легкой цепи антитела, и аминокислотная последовательность которого у разных антител отличается, где сайт связывается с антигеном. В трехмерной структуре антитела CDR образует петлю на поверхности антитела, а под петлей находится каркасная область (FR) для структурной поддержки CDR. В тяжелой цепи имеется три петлевые структуры, в легкой цепи имеется три петлевые структуры, и эти шесть пространственных петлевых структур объединены вместе для непосредственного контакта с антигеном.

Переменная область тяжелой цепи может содержать любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-11, а переменная область легкой цепи может содержать любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-15.

Кроме того, антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть любыми антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, выбранными из следующей группы:

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представлен-

ную под SEQ ID NO: 13;

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14; и

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15.

В случае если CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи или переменной области тяжелой цепи являются одинаковыми, можно модифицировать их каркасный участок. В частности аминокислотную последовательность части каркасного участка можно модифицировать для получения гуманизированного антитела.

Аминокислотные последовательности и SEQ ID NO антител к тау-белку согласно примерам из настоящего изобретения обобщены в табл. 1 и 2 ниже.

Таблица 1

Название ADEL	VH-CDR1	SEQ ID NO	VH-CDR2	SEQ ID NO	VH-CDR3	SEQ ID NO
Y01m01	GDSITSGY	1	IRYSGRT	2	ASVYFTY	3
Y01h01v01						
Y01h01v02						
Y01h01v03						
Y01h01v04						
Y01h01v05						
Y01h01v06						
Y01h01v07						
Y01h01v08						
Y01h01v09						
Y01h01v10						
Y01h01v11						
Y01h01v12						
Название ADEL	VL-CDR1	SEQ ID NO	VL-CDR2	SEQ ID NO	VL-CDR3	SEQ ID NO
Y01m01	QSLDSDGKTY	4	LVS	5	WQGSHPYTY	6
Y01h01v01						
Y01h01v02						
Y01h01v03						
Y01h01v04						
Y01h01v05						
Y01h01v06						
Y01h01v07						
Y01h01v08						
Y01h01v09						
Y01h01v10						
Y01h01v11						
Y01h01v12						

Таблица 2

Название ADEL	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	VL аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Y01m01	EVQLEESGPSLVKPSQTLSTL CSVTGDSITSGYWNWIRKFP GNKLEYMGYIRYSGRTYYN PSLKSRISITRDTSKNQFYLQ LISVTTEDTATYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	7	DVLMQTQPLTLSVTIGQP ASISCKSSQSLLDSDGKT YLNWLLQRPQGQSPKRLIS LVSKLDSGVPDRFTGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGV YYCWQGSHPYTFGGGT KLEIK	12
Y01h01v01	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTL TCTVSGDSITSGYWNWIRQP PGKGLEIYIGYIRYSGRTYYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	8	DVVMTQSPSLPVTLGQ PASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWFQQRPGQSPKRL ISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGSHPYTFG QGTKLEIK	13
Y01h01v02	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTL TCTVSGDSITSGYWNWIRQP PGKGLEIYIGYIRYSGRTYYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	8	DVVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLDSDGK TYLNWYQKPGQSPKRL ISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCWQGSHPYTFGQ GTKLEIK	14
Y01h01v03	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTL TCTVSGDSITSGYWNWIRQP PGKGLEIYIGYIRYSGRTYYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	8	EVVLTQSPGTLSPGER ATLSCKSSQSLLDSDGKT YLNWYQKPGQSPKRLI SLVSKLDSGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVY YCWQGSHPYTFGQGTK LEIK	15
Y01h01v04	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAVSGDSITSGYWNWIRQS PSRGGLEWLG YIRYSGRTYYN PSLKSRITINRDTSKNQFSLQ LNSVTPEDTAVYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	9	DVVMTQSPSLPVTLGQ PASISCKSSQSLLDSDGK TYLNWFQQRPGQSPKRL ISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGSHPYTFG QGTKLEIK	13
Y01h01v05	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAVSGDSITSGYWNWIRQS PSRGGLEWLG YIRYSGRTYYN PSLKSRITINRDTSKNQFSLQ LNSVTPEDTAVYYCASVYFT YWGGQTLVTVSS	9	DVVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLDSDGK TYLNWYQKPGQSPKRL ISLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCWQGSHPYTFGQ GTKLEIK	14

Y01h01v06	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAVSGDSITSGYWNWIRQSPSRGLEWLGYIRYSGRTYYNPSLKSRITINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	9	EVVLTQSPGTLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGQSPKRLISLVSKLDSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	15
Y01h01v07	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKALEYLAYIRYSGRTYYNPSLKSRITITRDTSKNQVVLTMNMDPVDATAYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	10	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	13
Y01h01v08	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKALEYLAYIRYSGRTYYNPSLKSRITITRDTSKNQVVLTMNMDPVDATAYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	10	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	14
Y01h01v09	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKALEYLAYIRYSGRTYYNPSLKSRITITRDTSKNQVVLTMNMDPVDATAYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	10	EVVLTQSPGTLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGQSPKRLISLVSKLDSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	15
Y01h01v10	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTVSGDSITSGYWNWFRQAPGKGLYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRFTISRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	11	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	13
Y01h01v11	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTVSGDSITSGYWNWFRQAPGKGLYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRFTISRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	11	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	14
Y01h01v12	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTVSGDSITSGYWNWFRQAPGKGLYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRFTISRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCASVYFTYWGGQTLVTVSS	11	EVVLTQSPGTLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGQSPKRLISLVSKLDSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCWQGSHPYTFGQGTKLEIK	15

Нуклеотидные последовательности антител к тау-белку согласно примерам из настоящего изобретения обобщены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Название ADEL	Нуклеотидная последовательность VH (SEQ ID NO)	Нуклеотидная последовательность VL (SEQ ID NO)
Y01m01	16	21
Y01h01v01	17	22
Y01h01v02	17	23
Y01h01v03	17	24
Y01h01v04	18	22
Y01h01v05	18	23
Y01h01v06	18	24
Y01h01v07	19	22
Y01h01v08	19	23
Y01h01v09	19	24
Y01h01v10	20	22
Y01h01v11	20	23
Y01h01v12	20	24

Используемый в данном документе термин "ADEL-Y01m" относится к мышинному антителу, которое специфически связывается с белковым фрагментом, который в аминокислотной последовательности тау-белка, представленной под SEQ ID NO: 25, содержит участок аминокислотной последовательности с положениями от 275 по 286, при этом аминокислота в положении 280 является ацетилированной. Кроме того, используемый в данном документе термин "ADEL-Y01h" относится к антителу, полученному за счет гуманизации антитела ADEL-Y01m.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть любым фрагментом, выбранным из группы, состоящей из Fab, scFv, F(ab')₂ и Fv. Фрагмент относится к антигенсвязывающим доменам без кристаллизуемой области (Fc-области), функция (эффакторная функция) которой заключается в передаче стимула, обусловленного связыванием с антигеном, к клетке, комплементу и т.п., и фрагмент может включать фрагмент 3-го поколения, такой как однодоменное антитело и минитело.

Преимущества фрагмента заключаются в том, что он характеризуется хорошим показателем проникновения через гематоэнцефалический барьер, поскольку размер фрагмента меньше, чем у полноструктурного IgG, и в том, что он характеризуется низкой стоимостью получения, поскольку его можно продуцировать в бактериях. Кроме того, поскольку у фрагмента антитела отсутствует Fc, фрагмент антитела используется в случае, когда нежелательной является функция передачи стимула, обусловленного связыванием антигена, к клетке, комплементу и т.п. Фрагмент пригоден для диагностики в живом организме вследствие его короткого периода полужизни в организме человека. Однако в случае если среди составляющих антитело аминокислот некоторые основные, кислотные или нейтральные аминокислоты заменены другими, изоэлектрическая точка (pI), присущая собственно антителу, может измениться. Такое изменение изоэлектрической точки антитела может привести к таким изменениям, как снижение токсического побочного эффекта антитела в условиях *in vivo* или повышение растворимости в воде. Следовательно, в случае терапевтического антитела, принимая во внимание его аффинность или структурную форму, можно использовать полноструктурный IgG.

Вариабельная область тяжелой цепи антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента может иметь последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7-11, или может характеризоваться 95%, 97%, 98% или 99% гомологией с последовательностью вариабельной области тяжелой цепи.

Вариабельная область легкой цепи антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента может иметь последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12-15, или может характеризоваться по меньшей мере 95%, 97%, 98% или 99% гомологией с последовательностью вариабельной области легкой цепи.

Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент могут характеризоваться по меньшей мере 95%, 97%, 98% или 99% гомологией с последовательностью вариабельной области тяжелой цепи, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7-11, и с последовательностью вариабельной области легкой цепи, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12-15.

Антитело к тау-белку может быть легко получено с помощью известной методики получения моноклонального антитела. Моноклональное антитело можно получать за счет получения гибридомы с использованием В-лимфоцитов от иммунизированного животного или с использованием методики фагово-

го дисплея. Однако способ получения моноклонального антитела не ограничивается указанными.

В варианте осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело, представляющее собой антитело к тау-белку, можно легко получать за счет получения в линии гибридомных клеток на основе В-лимфоцитов, которые получены при инъекции мышам белкового фрагмента (K280-ас), имеющего участок аминокислотной последовательности с положениями от 275 по 286 из аминокислотной последовательности тау-белка дикого типа под SEQ ID NO: 25, в котором аминокислота в положении 280 является ацетилированной.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, который кодирует антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент. В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий тяжелую или легкую цепь антитела, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента. В частности, полинуклеотид может содержать любую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-20, и/или любую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:21-24.

Полинуклеотид может представлять собой любой полинуклеотид, выбранный из следующей группы:
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO:21;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 17, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 17, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO:23;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 17, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO:23;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 19, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 19, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO:23;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 19, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22;
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO:23; и
 полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, и/или нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24.

Полинуклеотид может быть модифицированным с помощью замены, делеции или вставки из по меньшей мере одного основания или их комбинации. В случае если нуклеотидную последовательность получают за счет химического синтеза, можно использовать способы синтеза, хорошо известные в данной области техники, такие как описанные в Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988. Такие способы могут включать триэфирные, фосфитные, фосфорамидитные и Н-фосфатные способы, ПЦР и другие способы на основе автопраймеров, олигонуклеотидный синтез на твердых носителях и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид. Вектор экспрессии может представлять собой плазмидную ДНК, фаговую ДНК и т.п., а также может включать коммерчески разработанные плазмиды (pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP и т.п.), плазмиды, полученные из *E. coli* (pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 и т.п.), плазмиды, полученные из *Bacillus subtilis* (pUB110, pTP5 и т.п.), плазмиды, полученные из дрожжей (YEр13, YEр24, YCp50 и т.п.), фаговые ДНК (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11, λ ZAP и т.п.), векторы на основе вирусов животных (ретровируса, аденовируса, вируса коровьей оспы и т.п.), векторы на основе вирусов насекомых (бакуловируса) и т.п. В векторе экспрессии уровень экспрессии белка, его модификация и т.п. варьируются в зависимости от клеток-хозяев, и поэтому предпочтительно выбирать и использовать клетку-хозяина, наиболее подходящую для этой цели.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии. Клетка-хозяин для получения трансформированной клетки может включать без ограничения клетки млекопитающих, растений, насекомых, грибов или бактерий. В качестве клеток млекопитающих можно использовать клетки CHO, клетки F2N, клетки CSO, клетки ВНК, клетки меланомы Боуэса, клетки HeLa, клетки 911, клетки AT1080, клетки A549, клетки HEK293, клетки HEK293T и т.п.; однако клет-

ки млекопитающих не ограничиваются указанными. Можно использовать любую клетку, которая известна специалистам в данной области техники и может использоваться в качестве клетки-хозяина, представляющей собой клетку млекопитающего.

Кроме того, в случае если вектор экспрессии вводят в клетку-хозяина, можно использовать следующие способы: осаждение с CaCl_2 , способ Ханахана, в котором для повышения эффективности в сочетании с осаждением с CaCl_2 используется восстанавливающее вещество, называемое диметилсульфоксид (DMSO), электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, слияние протопластов, перемешивание с использованием волокна из карбида кремния, трансформацию, опосредованную *Agrobacterium*, ПЭГ-опосредованную трансформацию, использование сульфата декстрана, липофектамина, трансформацию, опосредованную высушиванием/ингибированием, и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем способ включает культивирование клетки-хозяина. В частности, способ получения может включать стадии: i) культивирования клетки-хозяина для получения культуры и ii) сбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры.

Стадию культивирования клетки-хозяина можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники. В частности, культивирование можно проводить в виде периодического процесса или проводить непрерывно в виде периодического процесса с подпиткой или повторяющегося периодического процесса с подпиткой.

Стадию сбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры можно проводить с использованием способов, известных в данной области техники. В частности, сбор можно проводить с помощью способов, включающих центрифугирование, фильтрацию, экстракцию, распыление, сушку, выпаривание, осаждение, кристаллизацию, электрофорез, фракционное растворение (например, осаждение с сульфатом аммония), хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гидрофобную или эксклюзионную хроматографию) и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена гибридома с номером доступа KCTC14155BP. Гибридома с номером доступа KCTC14155BP может продуцировать ADEL-Y01m. Что касается ADEL-Y01m, настоящим делается ссылка на приведенное выше описание антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента. В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания, причем фармацевтическая композиция содержит в качестве активного ингредиента антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

Дегенеративное неврологическое заболевание может представлять собой неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком. В частности, неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком, может представлять собой таупатию, первичную возрастную таупатию, хроническую травматическую энцефалопатию, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, лобно-височную деменцию, болезнь Литико-Бодига, паркинсонизм, подострый склерозирующий менингит, свиновую энцефалопатию, туберозный склероз, ганглиоцитому, ганглиоцитому, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Галлервордена-Шпатца или липофусциноз.

Кроме того, таупатия может представлять собой болезнь Альцгеймера (AD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), группу родственных нарушений, называемых совместно лобно-височной деменцией с паркинсонизмом, сцепленными с хромосомой 17 (FTDP-17), боковой амиотрофической склероз (ALS), болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), деменцию боксеров (DP), болезнь Герстманна-Штроусслера-Шейнкера (GSSD), болезнь с тельцами Леви, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ) или болезнь Гентингтона.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и адъювантов. Подходящие носители для фармацевтической композиции известны специалистам в данной области техники и могут включать без ограничения белки, сахара и т.п. Носители могут представлять собой водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры носителей, которые представляют собой неводные растворы, могут включать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, пищевое масло, такое как оливковое масло, и инъекционный органический сложный эфир, такой как этилолеат.

Примеры носителей, которые представляют собой водные растворы, могут включать воду, спиртоводный раствор, эмульсию или суспензию, которые включают физиологический раствор и буферную среду. Примеры носителей для парентерального введения могут включать раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучее масло. Примеры носителей для внутривенной инъекции могут включать электролитную добавку, такую как добавка на основе декстрозы Рингера, жидкость и пищевую добавку. Дополнительно могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы. Предпочтительные консерванты могут включать формалин, тимеросал, неомицин, полимиксин В и амфотерицин В.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать адъювант (иммуномодулирующее средство или иммуностимулирующее средство). Адъювант относится к соединению или смеси, которые

усиливают иммунный ответ и/или ускоряют скорость всасывания после инокуляции, и он может включать любой ускоритель всасывания. Приемлемые адьюванты могут включать без ограничения полный адьювант Фрейнда, неполный адьювант Фрейнда, сапонин, минеральный гель, такой как гидроксид алюминия, поверхностно-активное вещество, такое как лизолецитин, полиол Pluronic, полианионы, пептид, масло или углеводородную эмульсию, гемоцианин фисуреллы, динитрофенол и т.п.

Фармацевтическую композицию можно вводить посредством любого пути введения, выбранного из группы, состоящей из внутримозгового, интрацеребровентрикулярного, внутрибрюшинного, чрескожного, внутримышечного, интрадурального, внутривенного, подкожного и назального путей введения, и ее предпочтительно вводят с помощью внутримозгового, интрацеребровентрикулярного, интрадурального или внутрибрюшинного пути.

В частности, внутримозговое, интрацеребровентрикулярное или интрадуральное введение может быть применимым, поскольку при таком введении отсутствует необходимость рассмотрения проблемы проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Кроме того, внутримозговое введение можно применять в том случае, когда требуется узнать действие лекарственного средства на определенную область головного мозга путем прямого введения небольшого количества лекарственного средства в данную область. Интрацеребровентрикулярное введение представляет собой способ введения лекарственного средства в желудочек головного мозга, и его можно применять в том случае, когда требуется знать действие лекарственного средства во всей области головного мозга. Кроме того, интрадуральное введение представляет собой способ инъекции лекарственного средства в спинномозговой канал путем введения иглы в пространство вокруг спинного мозга между двумя позвонками в нижней части позвоночника, и оно может применяться в том случае, когда необходимо, чтобы лекарственное средство оказало быстрое или локальное действие на головной мозг, спинной мозг или ткани (мозговые оболочки), покрывающие головной мозг или спинной мозг.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению эффективно улучшало двигательную функцию, когнитивную функцию у животной модели индуцированной деменции при внутрибрюшинном введении, а также интрацеребровентрикулярном введении.

Фармацевтическую композицию вводят в фармацевтически эффективном количестве. Используемый в данном документе термин "фармацевтически эффективное количество" означает количество, которого достаточно для того, чтобы фармацевтическая композиция могла проявлять терапевтический эффект, не вызывая побочных эффектов или серьезных или чрезмерных иммунных ответов. Уровень эффективного количества может варьироваться в зависимости от различных факторов, включая нарушение, подлежащее лечению, тяжесть нарушения, активность конкретного соединения, путь введения, скорость, с которой белок удаляется, продолжительность лечения, лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с белком, возраст, массу тела, пол, особенности питания, общее состояние здоровья индивидуума, а также факторы, известные с медицинской точки зрения.

Дозу фармацевтической композиции желательно определять с учетом возраста, пола, состояния пациента, степени всасывания ее активного ингредиента в организме, скорости инактивации и лекарственных средств, применяемых в комбинации. Фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от 0,0001 мг/кг (массы тела) до 300 мг/кг (массы тела) в пересчете на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания, причем способ включает стадию введения антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента индивидууму, у которого ожидается развитие дегенеративного неврологического заболевания или у которого произошло развитие дегенеративного неврологического заболевания.

Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент являются такими, как описано выше.

Доза антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента варьируется в определенном диапазоне, в зависимости от массы тела, возраста, пола, состояния здоровья, диеты пациента, времени введения, способа введения, скорости выведения и тяжести заболевания. Одноразовую дозу можно вводить в количестве, составляющем от приблизительно 0,001 мг/кг до 300 мг/кг, ежедневно или еженедельно. Эффективное количество может определяться на усмотрение врача, который осуществляет лечение пациента.

Эффективное количество антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как возраст, масса тела пациента, характеристики и степень симптомов, типы текущего лечения, число курсов лечения, лекарственная форма и путь введения, и его могут легко определять эксперты в соответствующей области техники.

Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить вместе или последовательно с вышеупомянутым фармакологическим или физиологическим компонентом, и его также можно вводить в комбинации с дополнительным обычным терапевтическим средством, при этом антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить последовательно или одновременно с обычным терапевтическим средством. Такое введение может представлять собой однократное или многократное введение. Принимая во внимание все вышеперечисленные факторы, важно вводить то количе-

ство, которое является минимальным количеством и позволяет получать максимальные эффекты без побочных эффектов, и такое количество могут легко определить специалисты в данной области техники.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена композиция для диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем композиция содержит антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело к тау-белку может представлять собой антитело, которое связывается с модифицированным тау-белком. Данное антитело описано выше.

В частности, было определено, что ацетилирование аминокислоты в положении 280 в аминокислотной последовательности тау-белка вызывает агрегацию тау-белка и неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком. Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты в положениях от 278 по 284, с ацетилированной аминокислотой в положении 280, в аминокислотной последовательности тау-белка, представленной под SEQ ID NO: 25, и, в связи с этим, антитело к тау-белку или антигенсвязывающий фрагмент можно применять для более эффективной диагностики неврологического заболевания, опосредованного тау-белком.

В случае если применяется антитело, анализы для определения количества модифицированного тау-белка, который связывается с ним, включают без ограничения вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), радиоиммунодиффузию, иммунодиффузию Оухтерлони, ракетный иммуноэлектрофорез, иммуногистологическое окрашивание, анализ иммунопреципитации, анализ фиксации комплемента, применение сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS), метод белкового чипа и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для предупреждения, лечения или диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем набор содержит антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, вектор экспрессии или клетку-хозяина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем набор содержит антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

Набор можно применять для измерения уровня экспрессии модифицированного тау-белка в образце от индивидуума, для того чтобы диагностировать дегенеративное неврологическое заболевание. Кроме того, антитело, а также композиция, раствор или устройство, которое содержит одно или более других составляющих и подходит для метода анализа, могут быть включены в него для измерения уровня экспрессии модифицированного тау-белка.

Образец может быть получен от индивидуума с использованием известного способа. Используемый в данном документе термин "образец" включает без ограничения образец, такой как ткань, клетка, кровь и плазма крови, каждый из которых характеризуется различным уровнем экспрессии модифицированного тау-белка, и т.п.

Кроме того, стадию измерения содержания белка можно проводить с помощью вестерн-блоттинга, ELISA, радиоиммуноанализа, радиоиммунодиффузии, иммунодиффузии Оухтерлони, ракетного иммуноэлектрофореза, иммуногистологического окрашивания, анализа иммунопреципитации, анализа фиксации комплемента, FACS или метода белкового чипа. Однако настоящее изобретение не ограничивается этим.

С помощью вышеуказанных способов анализа можно сравнить количество комплекса антиген-антитело, образовавшегося у здорового контроля, с количеством комплекса антиген-антитело, образовавшегося у индивидуума, и определить неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком.

Используемый в данном документе термин "комплекс антиген-антитело" означает конъюгат модифицированного тау-белка со специфическим для него антителом, а количество образовавшегося комплекса антиген-антитело можно измерять количественно по величине сигнала детектируемой метки. Такая детектируемая метка может быть выбрана из группы, состоящей из ферментов, флуоресцентных веществ, лигандов, люминесцентных веществ, микрочастиц, окислительно-восстановительных молекул и радиоизотопов, но не обязательно ограничивается ими. В случае если в качестве детектируемой метки используется фермент, доступные ферменты включают β -глюкуронидазу, β -D-глюкозидазу, β -D-галактозидазу, уреазу, пероксидазу, щелочную фосфатазу и т.п. Лиганды включают без ограничения производные биотина и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента для получения лекарственного препарата для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания.

Далее в данном документе настоящее изобретение будет описано подробно в виде примеров. Однако следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения, и настоящее изобретение ими не ограничивается.

1. Получение фрагментов модифицированного тау-белка и антител против них.

Пример получения 1. Получение фрагментов модифицированного тау-белка.

Чтобы получить фрагменты модифицированного тау-белка, в аминокислотной последовательности тау-белка (2N4R), которая состоит из 441 аминокислоты, выбирали фрагменты тау-белка, которые участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера и для которых проявляется эффект улучшения когнитивной функции после активной иммунизации мышшиной модели с модифицированным геном тау. Как проиллюстрировано на фиг. 1, в аминокислотных последовательностях фрагментов тау-белка, расположенных в связывающем микротрубочки домене, отмечен участок, состоящий из 12 аминокислот.

В частности, белковый фрагмент, который в аминокислотной последовательности тау-белка дикого типа под SEQ ID NO: 25 содержит участок аминокислотной последовательности с положениями от 275 по 286, при этом аминокислота в положении 280 является ацетилированной, обозначили как K280-ас. Белковый фрагмент K280-ас получали по запросу на его получение в Pertron Inc.

Кроме того, белковый фрагмент K280-ас со связанным на N-конце гемоцианином фиссурелы (KLH) получали по запросу на его получение в ANYGEN Inc. (Нам-Мён, Южная Корея). Белковый фрагмент K280-ас со связанным на N-конце KLH очищали с использованием системы Shimadzu HPLC 10AVP (чистота 91,8%) в условиях градиента концентрации от 5% до 65% ацетонитрила в 0,05% TFA.

Кроме того, белковый фрагмент из повторяющихся доменов (RD) 1, 2, 3 и 4, который содержит в аминокислотной последовательности тау-белка дикого типа под SEQ ID NO: 25, аминокислоты в положениях от 244 до 372 (SEQ ID NO: 26), обозначили как K18. Вектор, который содержит ген, кодирующий белковый фрагмент K18, трансдуцировали в клетки *E. coli* для получения белкового фрагмента K18.

В частности, белковый фрагмент K18 получали следующим образом. Сначала вектор экспрессии pET-21b-Taу (K18) (фиг. 2) трансдуцировали в *E. coli* BL21 (DE3) и культивировали при температуре 37°C в среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, до достижения оптической плотности (O.D.) 0,6-0,8 при длине волны 600 нм. После этого проводили обработку с помощью IPTG в концентрации 0,5 мМ и полученный продукт культивировали при температуре 37°C в течение 3 часов и культивировали при температуре 18°C в течение 18 часов.

Через 18 ч образовавшуюся одиночную колонию культивировали с получением стартовой культуры в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, при температуре 37°C и 220 об/мин в течение приблизительно 16 часов. Стартовую культуру инокулировали при отношении 1:500 в колбу Эрленмейера, в которую помещали 5 л среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, а затем культивировали при температуре 37°C в течение 4 ч. После этого культуру центрифугировали при 3500 об/мин в течение 30 мин. Затем супернатант удаляли, а оставшийся осадок замораживали при температуре -20°C.

Замороженный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис-НСl, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, рН 8,0) в количестве 25 мл/г. Клетки лизировали в течение 30 минут с использованием ультразвукового гомогенизатора JY99-IIDN при мощности 1500 Вт. После этого полученный продукт центрифугировали при температуре 4°C и 15000 об/мин в течение 20 мин, а супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Фильтрат фильтровали через колонку His-Trap SP объемом 5 мл, уравновешенную буфером А (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0). Чтобы удалить неспецифическое связывание, проводили промывку 5 объемами колонки (CV) буфера А, а затем проводили элюирование с градиентом концентрации от 0 до 1 М NaCl с использованием 10 CV буфера В (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl).

Собирали фракции, содержащие белковый фрагмент K18, и затем фракции фильтровали через колонку Hi-Trap SP объемом 5 мл, уравновешенную буфером С (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 50 мМ имидазола). Чтобы удалить неспецифическое связывание, проводили промывку с помощью 10 CV буфера С. После этого проводили элюирование с помощью 20 CV буфера D (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 100 мМ имидазола). Элюат, содержащий очищенный белковый фрагмент K18, концентрировали с использованием центрифужного фильтра с отсечением по молекулярной массе 10 кДа.

Ацетилированный белковый фрагмент K18 (асK18) получали путем осуществления реакции буфера для ацетилирования, состоящего из (2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, 10 мМ, рН 7,4), 50 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дитиотреитола (ДТТ), 2,5 мМ EGTA, 0,1 мМ EDTA, с белковым фрагментом K18 в концентрации 8 мкМ, ацетил-КоА в концентрации 125 мкМ и 0,5 мкг фермента P300, представляющего собой ацетилтрансферазу, при температуре 30°C в течение 3 ч.

Агрегат белковых фрагментов K18 готовили путем растворения белковых фрагментов K18 в концентрации 25 мкМ в 25 мМ растворе ДТТ в течение 1 ч при температуре 24°C и проведения взбалтывания в растворе (2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, 10 мМ, рН 7,4), NaCl (100 мМ), гепарина (25 мМ) с использованием Eppendorf Thermomixer С при температуре 37°C и 700 об/мин.

Пример получения 2. Получение антитела, связывающегося с фрагментом модифицированного тау-белка.

Антитело, которое специфически связывается с белковым фрагментом K280-ас, полученным в примере получения 1, получали по запросу на его получение в AbFrontier, южнокорейской компании по разработке мышшиных моноклональных антител. В-лимфоциты, полученные при инъекции белкового фраг-

мента K280-ас в качестве антигена мышам, получали в качестве гибридных клеток. После этого клеточную линию, продуцирующую антитела, которые специфически связываются с белковым фрагментом K280-ас, подвергали скринингу с помощью ELISA. Кроме того, исследователи по разработке антител в университетах Южной Кореи проводили скрининг библиотеки фагового дисплея для разработки антител, которые специфически связываются с белковым фрагментом K280-ас.

В итоге окончательно отобрали одну линию мышинных гибридных клеток (линия клеток мышинной гибридомы), а кандидатов, отобранных при скрининге библиотеки фагового дисплея, исключили, поскольку они продуцировали антитела, характеризующиеся более низкой аффинностью, чем продуцируемые в линии мышинных гибридных клеток. Антитело, полученное из линии мышинных гибридных клеток, проверяли в условиях *in vitro* на связывание с белковым фрагментом K280-ас посредством вестерн-блоттинга и ELISA.

В итоге определили, что антитело, полученное из линии гибридных клеток № 15E5 (клон № 1), являлось антителом, которое специфически связывалось с белковым фрагментом K280-ас (фиг. 3 и 4). Антитело, продуцируемое из линией гибридных клеток № 15E5, окончательно отобрали и обозначили как ADEL-Y01m.

Взяв за исходное данное мышинное антитело, получали гуманизированные антитела с использованием общеизвестных методов, включая анализ варибельных областей антитела, исследование CDR, молекулярное моделирование, анализ человеческих антител зародышевой линии, прививание CDR и секвенирование генов, и данные гуманизированные антитела обозначали как ADEL-Y01h (v01-v10).

В свою очередь, линию гибридных клеток № 15E5 депонировали в Корейскую коллекцию типовых культур (KCTC) 18 марта 2020 г., и ей был присвоен номер доступа микроорганизма KCTC 14155BP.

Экспериментальный пример 1. Определение антигенспецифического связывания.

Чтобы определить специфическое связывание антитела ADEL-Y01m, полученного в примере получения 2, с ацетилированным тау-белком, тау-белок дикого типа и тау-белок (Тау-K280A), в котором аминокислота лизин в положении 280 заменена аланином, ацетилировали в условиях *in vitro*. В данном случае ацетилирование тау-белка дикого типа и тау-белка K280A проводили таким же образом, как и в способе получения ацетилированного белкового фрагмента K18 в примере получения 1. Затем посредством вестерн-блоттинга проверяли реакцию специфического связывания антиген-антитело для антитела ADEL-Y01m.

Сначала измеряли концентрации тау-белка дикого типа и тау-белка K280A посредством анализа Брэдфорда. Каждый из белков смешивали с 4X буфером для образцов (60 мМ Трис-НСl [рН6,8], 2% вес/об. SDS, 25% (об./об.) глицерина, 14,4 мМ (об./об.) р-меркаптоэтанола и бромфенолового синего). После этого каждый белок подвергали электрофорезу на геле SDS-PAGE. Затем гель с проведенным электрофорезом отделяли и переносили на мембрану из PVDF (BioRad, Калифорния, США). Проводили обработку блокирующим буфером (0,1% об./об. Твин-20 [PBST], 3% вес./об. BSA или 5% об./об. обезжиренного молока в буфере PBS), и реакцию оставляли осуществляться в течение 1 часа. Затем проводили обработку антителом к ацетиллизину (анти-ацетиллизин, Cell Signaling, 9441) или антителом ADEL-Y01m в качестве первичного антитела, и реакцию оставляли осуществляться на протяжении ночи при 4°C. На следующий день мембрану из PVDF трижды промывали промывочным буфером (0,1% об./об. Твин-20 [PBST] в буфере PBS), а затем обрабатывали меченным HRP антителом к IgG мыши (Bioxcell, BE0083). Мембрану из PVDF обрабатывали хемилюминесцентным реагентом (Thermo Fisher Scientific). Затем проводили измерения и анализ с использованием рентгеновской пленки и программного обеспечения ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США).

В итоге определили, что антитело ADEL-Y01m не связывалось с белком Тау K280A и с ацетилированным белком Тау K280A (фиг. 5). На основании этих результатов определили, что антитело ADEL-Y01m являлось антителом, которое специфически связывается только с тау-белком, в котором ацетилирована аминокислота лизин в положении 280.

Кроме того, чтобы определить специфическое связывание с антителом ADEL-Y01h01_v01, полученным в примере получения 2, проводили вестерн-блоттинг таким же образом, как описано выше, с использованием белкового фрагмента K280-ас и белкового фрагмента K18. В данном случае использовали антитело ADEL-Y01h01_v01 и меченное HRP антитело к IgG человека (Bioxcell, BE0297).

В итоге определили, что антитело ADEL-Y01h01_v01 проявляло высокую аффинность антитела к белковому фрагменту K280-ас (фиг. 6).

Экспериментальный пример 2. Определение аффинности антиген-антитело.

Аффинность между белковым фрагментом K280-ас, полученным в примере получения 1, и антителом ADEL-Y01m, полученным в примере получения 2, измеряли посредством системы Octet® K2 (Fortebio).

Антитело ADEL-Y01m фиксировали на биосенсоре AR2G в соответствии с инструкцией производителя. Поверхность биосенсора увлажняли водой в течение 10 минут, а затем активировали с использованием смеси 20 мМ гидрохлорида 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодимид (EDC) и 10 мМ N-гидроксисульфосукцинимид (s-NHS). Антитело ADEL-Y01m фиксировали на активированном биосен-

соре с использованием 10 мМ буфера на основе ацетата натрия (pH 5,0) и гасили с помощью 1 М этаноламина (pH 8,0) в течение 5 мин. Биосенсор, на котором зафиксировано антитело ADEL-Y01m, погружали в 1X буфер PBS (pH 7,4) на 60 секунд для установления исходного уровня. Затем биосенсор погружали на 60 секунд в лунки, содержащие различные концентрации белкового фрагмента K280-ас (антигена) или пептида, связанного с BSA. После этого биосенсор снова погружали в 1X буфер PBS (pH 7,4) на 10 мин, чтобы произошла диссоциация. Экспериментальные данные оценивали с помощью Octet Data Analysis (версия ПО: 9.0.0.10).

В итоге измерили, что для аффинности между антителом ADEL-Y01m и белковым фрагментом K280-ас значение константы диссоциации антигена (K_d) составляет $2,57 \times 10^{-10}$ М (фиг. 7).

Кроме того, с помощью ELISA измеряли связывание белкового фрагмента K280-ас, полученного в примере получения 1, с антителами ADEL-Y01h (v01-v12), полученными в примере получения 2.

Сначала планшеты обрабатывали белковым фрагментом K280-ас из расчета 250 нг/лунка и реакцию оставляли осуществляться на протяжении ночи при 4°C. На следующий день проводили тройную отмывку с помощью промывочного буфера, а затем проводили обработку первичным антителом в 8 концентрациях (2 мкг, 1 мкг, 0,5 мкг, 0,25 мкг, 0,12 мкг, 0,06 мкг, 0,03 мкг, 0,01 мкг). В качестве вторичного антитела использовали меченное HRP антитело к IgG человека.

В итоге определили, что антитела ADEL-Y01h (v01-v10) проявляли высокую аффинность антитела к белковому фрагменту K280-ас (фиг. 8).

II. Определение терапевтических эффектов, обусловленных антителом ADEL-Y01m, с использованием животной модели.

Пример получения 3. Получение мышинной модели деменции.

Мышей JNPL3, экспрессирующих мутантный ген Tau-P301L, приобретали в Taconic и в течение пяти поколений подвергали возвратному скрещиванию с мышами C57b1/6 в лаборатории для экспериментальных животных Асанского института биологических наук, Южная Корея. Затем мышей выращивали в условиях, свободных от специфических патогенов (SPE).

Экспериментальный пример 3. Определение характеристик мышинной модели деменции.

Для используемой в экспериментах мышинной модели деменции Tau-P301L показано отличие в накоплении тау-белка в ткани головного мозга по мере старения по сравнению со здоровыми мышами. Проводили иммуноблоттинг с использованием антитела ADEL-Y01m, полученного в примере получения 2.

У здоровых мышей и мышей с деменцией Tau-P301L извлекали головной мозг, и затем белки из тканей головного мозга разделяли на растворимые и нерастворимые в саркозиле фракции. Образцы головного мозга гомогенизировали с помощью RABuffer B (100 мМ MES, 0,75 М NaCl, 1 мМ EGTA, 0,5 мМ MgSO₄, 2 мМ DTT, pH 6,8 + ингибиторы протеазы/фосфатазы). Образцы инкубировали на льду в течение 20 минут и центрифугировали при 9000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. После центрифугирования собирали супернатант (растворимые белки). Осадок гомогенизировали с помощью буфера для экстрагирования (1% саркозила, 10 мМ Трис, 10% сахарозы, 0,85 М NaCl, 1 мМ EGTA, pH 7,4). Образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. После центрифугирования собирали супернатант (агрегаты тау-белка). Разделенные белки подвергали вестерн-блоттингу таким же образом, как в экспериментальном примере 1.

В итоге определили, что у мышинной модели деменции возрастом 12 месяцев проявлялось увеличение числа ацетилированных тау-белков в тканях головного мозга. В частности, определили, что у мышинной модели деменции возрастом 4 месяца проявлялся уровень экспрессии тау-белка, аналогичный таковому у здоровых мышей, тогда как у мышинной модели деменции возрастом 12 месяцев, демонстрирующей симптомы ярко выраженной деменции, проявлялся уровень экспрессии тау-белка, который в приблизительно 2 раза превышал таковой в сравнении со здоровыми мышами (фиг. 9).

Экспериментальный пример 4. Определение эффекта улучшения поведения, обусловленного антителом ADEL-Y01m: интрацеребровентрикулярное введение.

Чтобы определить терапевтические эффекты, обусловленные антителом ADEL-Y01m, антитело ADEL-Y01m вводили в боковой желудочек мышам с деменцией Tau-P301L, полученным в примере получения 3, с использованием осмотического насоса в соответствии со схемой эксперимента, проиллюстрированной на фиг. 10.

Экспериментальный пример 4.1. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста на построение гнезда.

Проводили тест на построение гнезда, который может определять мультимодальную функцию головного мозга мышей.

В частности, из клетки, в которой выращивали мышей, удаляли две трети подстилки и в клетку помещали четыре слоя стерильной ваты (5 см×5 см). В одну клетку можно было запустить одну мышь. На следующее утро анализировали степень готовности гнезда.

Балл в соответствии с готовностью гнезда рассчитывали путем деления его на 1-5 пунктов. В случае если предоставленная стерильная вата сохранялась на уровне 90% или больше или была едва тронута, такой случай оценивали как 1 пункт; а в случае если стерильная вата сохранялась на уровне от прибли-

тельно 50% до 90% и была частично разорвана, такой случай оценивали как 2 пункта. В случае если стерильная вата была разорвана на 50% или больше и разбросана по всей клетке, такой случай оценивали как 3 пункта; а в случае если стерильная вата была разорвана на 90% или больше и собрана с одной стороны клетки, такой случай оценивали как 4 пункта. В случае если стерильная вата была полностью разорвана и на одной стороне клетки была образована полная форма гнезда, такой случай оценивали как 5 пунктов.

В итоге определили, что для мышей с деменцией Tau-P301L показано приблизительно 60% снижение балла построения по сравнению со здоровыми мышами, и что для мышей с деменцией (Tau-P301L-ADEL-Y01m), которым было введено антитело ADEL-Y01m, показан балл построения, аналогичный таковому у здоровых мышей (фиг. 11).

Экспериментальный пример 4.2. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с Y-образным лабиринтом.

Тест с Y-образным лабиринтом проводили для определения восстановления когнитивной функции. Тест с Y-образным лабиринтом представляет собой эксперимент по определению способности к кратковременной памяти. В частности, зоны А, В и С устанавливали в коробке Y-образной формы, и мышам позволяли свободно передвигаться в течение 5 мин в состоянии, когда зона В была заблокирована. Через час состояние, когда зона В была заблокирована, устраняли, и в течение 5 мин наблюдали за передвижением мышей в состоянии, когда все зоны были открыты.

В итоге в случае мышей Tau-P301L время пребывания в зоне А или С составляло 100 секунд или меньше, что было на приблизительно 50% меньше по сравнению со здоровыми мышами. С другой стороны, в случае мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, время пребывания в зоне А или С составляло примерно 150 секунд, что было аналогично здоровым мышам. На основании этих результатов определили, что способность к кратковременной памяти у мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m восстанавливается (фиг. 12).

Экспериментальный пример 4.3. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с водным лабиринтом.

Тест с подводным лабиринтом проводили для оценки способности мышей к обучению и памяти. В качестве оборудования и программы, используемых для теста с подводным лабиринтом, использовали оборудование для исследования поведения, принадлежащее лаборатории для экспериментальных животных Асанского института биологических наук. В частности, тест с подводным лабиринтом занял в общей сложности 5 дней. Мышей обучали в течение 4 дней в состоянии, когда была установлена платформа и визуальная подсказка для определения местоположения платформы.

Обучение проводили путем наполнения плавательного бассейна (диаметр 1,4 м, глубина 45 см) с платформой водой ($29 \pm 0,5^\circ\text{C}$) до глубины приблизительно 26,5 см, а затем в него добавляли 1,5 л цельного сухого молока, чтобы сделать воду мутной, так что мыши могли бы запомнить платформу только с помощью подсказки. Затем мышей адаптировали к свободному плаванию в течение 60 секунд и позволяли отдыхать на платформе в течение 1 минуты. Эксперимент проводили в общей сложности 12 раз с 4 подходами при трех различных начальных положениях. В конце каждого теста делали 30 с перерыва. По окончании одного подхода делали перерыв 30-45 мин.

После 4 дней обучения на 5-й день проводили тест. В эксперименте по оценке платформу не устанавливали и измеряли число пребываний в области, где была размещена платформа, чтобы определить, хорошо ли мыши посещали местоположение платформы, используя только подсказку. Кроме того, мышам позволяли добираться до местоположения, где была размещена платформа, в течение одной минуты. Если мыши не достигали местоположения платформы в течение одной минуты, мышей удаляли из бассейна.

Сначала измеряли время, необходимое мышам для нахождения платформы в течение 4 дней обучения. В итоге в случае мышей Tau-P301L время, необходимое для нахождения платформы, в течение 4 дней составляло 20 секунд или больше. С другой стороны, в случае здоровых мышей и мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, время, необходимое для нахождения платформы, уменьшалось до 20 секунд или меньше, начиная со 2-го дня (фиг. 13).

Кроме того, на 5-й день проводили оценку времени пребывания в зоне NW, где была помещена платформа. В итоге определили, что мыши Tau-P301L остаются в зоне NW в течение 10 с или меньше, тогда как здоровые мыши и мыши с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, остаются в зоне NW в течение 20 секунд или меньше (фиг. 14).

Экспериментальный пример 4.4. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста на силу захвата.

Для определения мышечной силы мышей проводили тест на силу захвата. В качестве пучка железа, используемого в экспериментах, использовали оборудование для исследования поведения, принадлежащее Асанскому институту биологических наук. В данном случае в качестве пучка железа использовали связку железа массой 40 г. Мышей, подготовленных в примере получения 3, удерживали за кончик хвоста и добивались помещения передней лапы мышей на пучок железа массой 40 г, так что мыши могли схватить пучок железа. Затем мышей поднимали на высоту приблизительно 30 см в состоянии, когда их

удерживали за хвост. Измеряли время до того, как мыши отпускали пучок железа, и проводили сравнение с соответствующими мышами.

В итоге здоровые мыши демонстрировали измеренное время силы захвата, составлявшее 20 секунд или меньше, а мыши с деменцией Тау-P301L демонстрировали измеренное время силы захвата, составлявшее 5 секунд или меньше. Напротив, в случае мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, измеренное время силы захвата составило 20 секунд или больше, что было больше, чем у здоровых мышей (фиг. 15). На основании этих результатов определили, что двигательная способность мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, восстанавливается.

Экспериментальный пример 5. Определение эффекта улучшения поведения у антитела ADEL-Y01m: внутривнутрибрюшинное введение.

Чтобы определить терапевтическую эффективность антитела ADEL-Y01m, антитело ADEL-Y01m вводили внутривнутрибрюшинно мышам с деменцией Тау-P301L, полученным в примере получения 3, в течение 3 месяцев в соответствии со схемой эксперимента, проиллюстрированной на фиг. 16.

Экспериментальный пример 5.1. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста на построение гнезда.

Тест на построение гнезда, который может определять мультимодальную функцию головного мозга мышей, проводили таким же образом, как в экспериментальном примере 4.1.

В итоге определили, что для мышей с деменцией Тау-P301L показано приблизительно 60% снижение балла построения по сравнению со здоровыми мышами, и что для мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, показан балл построения, аналогичный таковому у здоровых мышей (фиг. 17).

Экспериментальный пример 5.2. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с Y-образным лабиринтом.

Тест с Y-образным лабиринтом проводили так же, как в экспериментальном примере 4.2, для определения восстановления когнитивной функции. В итоге в случае мышей Тау-P301L время пребывания в зоне А или С составляло приблизительно 80 секунд, что было на приблизительно 50% меньше по сравнению со здоровыми мышами. С другой стороны, в случае мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, время пребывания в зоне А или С составляло примерно 110 секунд, что было аналогично здоровым мышам. На основании этих результатов определили, что способность к кратковременной памяти у мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m восстанавливается (фиг. 18).

Экспериментальный пример 5.3. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с водным лабиринтом.

Тест с подводным лабиринтом проводили так же, как и в эксперименте 4.3. Измеряли время, необходимое мышам для нахождения платформы в течение 4 дней обучения. В итоге в случае мышей Тау-P301L время, необходимое для нахождения платформы, в течение 4 дней составляло 20 секунд или меньше. С другой стороны, в случае здоровых мышей и мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, время, необходимое для нахождения платформы, уменьшалось до 15 секунд или меньше, начиная с 3-го дня (фиг. 19).

Кроме того, на 5-й день проводили оценку времени пребывания в зоне NW, где была помещена платформа. В итоге определили, что мыши Тау-P301L остаются в зоне NW в течение 20 с или меньше, тогда как здоровые мыши и мыши с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, остаются в зоне NW в течение приблизительно 25 с (фиг. 20).

Экспериментальный пример 6. Определение I специфического связывания между антителом ADEL-Y01m и модифицированным тау-белком, экспрессируемым в тканях мыши.

Ткани коры головного мозга и гиппокампа здоровых мышей и мышей с деменцией Тау-P301L, полученных в примере получения 3, подвергали иммунопреципитации (IP) и вестерн-блоттингу с использованием IgG и антитела ADEL-Y01m.

Сначала готовили буфер для образцов путем добавления к дистиллированной воде 1% Тх-100, 100 мМ NaCl и 50 мМ HEPES и корректирования pH до pH 7,4. Впоследствии буфер для образцов использовали для ресуспендирования тканей коры головного мозга и гиппокампа здоровых мышей и мышей с деменцией Тау-P301L, таким образом получали ресуспендированные образцы. Каждый из полученных образцов обрабатывали IgG или антителом ADEL-Y01m и реакцию оставляли осуществляться в течение 24 ч. Затем образец обрабатывали с помощью 100 мкл агарозных гранул с белком G (GE Healthcare Life Sciences) и реакцию оставляли осуществляться на протяжении ночи при 4°C. На следующий день проводили центрифугирование при 6000 об/мин в течение 1 минуты при 4°C для сбора образца и выполняли тройную промывку с помощью PBS, содержащего 0,1% Triton X-100. Образец обрабатывали 1X буфером для образцов и подвергали вестерн-блоттингу. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали IgG, антитело ADEL-Y01m и меченное HRP антитело к IgG мыши.

В итоге определили наличие специфической реакции связывания между антителом ADEL-Y01m и тау-белком (Tau-acK280), в котором аминокислота лизин в положении 280 является ацетилированной, в тканях коры головного мозга и гиппокампа мышей с деменцией Tau-P301L. Кроме того, на основании этих результатов определили, что антитело ADEL-Y01m хорошо связывается с модифицированным тау-белком, экспрессируемым в ткани головного мозга в условиях *in vivo* (фиг. 21).

Экспериментальный пример 7. Определение II связывания между антителом ADEL-Y01m и модифицированным тау-белком, экспрессируемым в тканях человека.

Чтобы определить специфическое связывание между антителом ADEL-Y01m и модифицированным тау-белком, экспрессируемым в ткани головного мозга человека, образцы височной коры из тканей головного мозга здоровых пожилых людей и пациентов с болезнью Альцгеймера подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с использованием антитела ADEL-Y01m.

Сначала из каждого образца височной коры из тканей головного мозга здоровых пожилых людей и пациентов с болезнью Альцгеймера делали срезы и прикрепляли их к предметному стеклу. Ткани головного мозга предоставлены Нидерландским банком тканей головного мозга. Срез промывали с помощью 1X PBS и проводили пропитывание с помощью 1X PBS, содержащего 0,1% Triton X-100, при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем срез промывали и блокировали с помощью PBS, содержащего 3% BSA, при комнатной температуре в течение 1 ч. Срез промывали с помощью 1X PBS и проводили реакцию с антителом ADEL-Y01m на протяжении ночи при 4°C.

На следующий день для окрашивания диаминобензидином (DAB) срез, полученный при проведении реакции с первичным антителом на протяжении ночи, промывали с помощью 1X PBS. Осуществляли реакцию среза с биотинилированным антителом к IgG мыши (Vector Laboratories, Калифорния, США) в качестве вторичного антитела при комнатной температуре в течение 1 ч. Срез промывали с помощью 1X PBS, обрабатывали комплексом авидин-биотин-пероксидаза (Vector Laboratories, Калифорния, США) и оставляли для осуществления реакции. Срез ткани головного мозга оставляли для осуществления реакции на 10 минут в растворе DAB, а затем промывали с помощью 1X PBS. Срез заключали в канадский бальзам (Sigma-Aldrich). Срез визуализировали с использованием микроскопа Zeiss (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия), а изображения обрабатывали с использованием системы визуализации AxioVision.

В итоге окрашивание антителом ADEL-Y01m не наблюдали в образцах височной коры здоровых пожилых людей, тогда как окрашивание антителом ADEL-Y01m наблюдали в образцах височной коры пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, на основании этих результатов определили, что антитело ADEL-Y01m хорошо связывается с модифицированным тау-белком, экспрессируемым в ткани головного мозга в условиях *in vivo* (фиг. 22).

Кроме того, ткани головного мозга здоровых пожилых людей и пациентов с болезнью Альцгеймера анализировали посредством вестерн-блоттинга. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к Tau5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077), антитело к β -амилоиду (Covance, SIG-39300), антитело к GAPDH (Millipore, MAB374) и меченное HRP антитело к IgG человека.

В итоге в тканях головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдали повышенные уровни экспрессии полного тау-белка, ацетилированного тау-белка и β -амилоида по сравнению с тканями головного мозга здоровых пожилых людей (фиг. 23A). В частности, в тканях головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдали в приблизительно 3 раза большее количество ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) (фиг. 23B).

Экспериментальный пример 8. Определение эффекта облегчения таупатии после интрацеребровентрикулярного введения антитела ADEL-Y01m.

Чтобы определить эффект облегчения таупатии после введения антитела ADEL-Y01m, извлекали ткани головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым были интрацеребровентрикулярно введены IgG или антитело ADEL-Y01m, и здоровых мышей, а также посредством вестерн-блоттинга проверяли уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилированного тау-белка (Tau-acK280) и тау-белка (Ser396), полученного фосфорилированием серина, аминокислоты в положении 396 аминокислотной последовательности тау-белка. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к Tau5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к pSer396 (Thermo, 44-752G), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге определили, что полный тау-белок, ацетилированный тау-белок и фосфорилированный тау-белок присутствуют в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG, в больших количествах, чем в тканях головного мозга здоровых мышей. С другой стороны, полный тау-белок, ацетилированный тау-белок и фосфорилированный тау-белок присутствовали в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым было интрацеребровентрикулярно введено антитело ADEL-Y01m, в меньших количествах, чем в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG (фиг. 24-27).

Кроме того, проводили иммуногистохимическое окрашивание для определения уровней экспрессии

тау-белка (pSer202/pThr205), полученного путем фосфорилирования аминокислоты серина в положении 202 и аминокислоты треонина в положении 205 аминокислотной последовательности тау-белка, и фосфорилированного тау-белка (pT231) в тканях головного мозга мышей. В данном случае иммуногистохимическое окрашивание проводили так же, как в экспериментальном примере 7, а в качестве первичных антител использовали антитело к AT8 (Thermo, MN1020) и антитело к pT231 (Thermo, MN1040).

В итоге в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG, наблюдали повышенный уровень экспрессии фосфорилированного тау-белка по сравнению с тканями головного мозга здоровых мышей. С другой стороны, сниженный уровень экспрессии фосфорилированного тау-белка наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым было интрацеребровентрикулярно введено антитело ADEL-Y01m, по сравнению с тканями головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG (фиг. 28 и 29).

Экспериментальный пример 9. Определение эффекта облегчения таупатии после внутрибрюшинного введения антитела ADEL-Y01m.

Чтобы определить эффект облегчения таупатии после введения антитела ADEL-Y01m, извлекали ткани головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым были внутрибрюшинно введены IgG или антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей, а также посредством полуденатурирующего вестерн-блоттинга проверяли уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилированного тау-белка и фосфорилированного тау-белка (pT231). В данном случае полуденатурирующий вестерн-блоттинг проводили так же, как вестерн-блоттинг в экспериментальном примере 1, за исключением того, что ткань головного мозга мыши смешивали с 2X буфером для образцов Лэммли без Р-меркаптоэтанола. Кроме того, использовали антитело к Tau5 (Invitrogen, AHB0042), антитело к pT231 (Thermo, MN1040), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге определили, что олигомерная форма полного тау-белка, фосфорилированного тау-белка и ацетилированного тау-белка присутствовала в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG, в больших количествах, чем в тканях головного мозга здоровых мышей. С другой стороны, полный тау-белок, фосфорилированный тау-белок и ацетилированный тау-белок присутствовали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L-ADEL-Y01m, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m, в значительно меньших количествах, чем в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG (фиг. 30-33).

Экспериментальный пример 10. Определение эффекта улучшения синапсов, обусловленного антителом ADEL-Y01m: интрацеребровентрикулярное введение.

Чтобы определить эффект улучшения синапсов после введения антитела ADEL-Y01m, извлекали ткани головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым были интрацеребровентрикулярно введены IgG или антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей, а также проводили вестерн-блоттинг в отношении белков, связанных с синапсами. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к PSD95 (Abcam, ab2723), антитело к синапсину-1 (Chemicon, MAB355), антитело к β -актину (Sigma, A5441) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге повышенные уровни экспрессии PSD59 и синапсина-1 наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG, по сравнению с тканями головного мозга здоровых мышей. С другой стороны, сниженные уровни экспрессии PSD59 и синапсина-1 наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым было интрацеребровентрикулярно введено антитело ADEL-Y01m, по сравнению с тканями головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был интрацеребровентрикулярно введен IgG (фиг. 34-36).

Экспериментальный пример 11. Определение эффекта улучшения синапсов, обусловленного антителом ADEL-Y01m: внутрибрюшинное введение.

Чтобы определить эффект улучшения синапсов после введения антитела ADEL-Y01m, извлекали ткани головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым были внутрибрюшинно введены IgG или антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей, а также проводили вестерн-блоттинг в отношении белков, связанных с синапсами. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 10.

В итоге повышенные уровни экспрессии PSD59 и синапсина-1 наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG, по сравнению с тканями головного мозга здоровых мышей. С другой стороны, сниженные уровни экспрессии PSD59 и синапсина-1 наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m, по сравнению с тканями головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG (фиг. 37-39).

Экспериментальный пример 12. Определение проникновения антитела ADEL-Y01m в ткань головного мозга и его связывания с антигеном после внутрибрюшинного введения антитела ADEL-Y01m.

Чтобы определить распределение антител в ткани головного мозга после внутрибрюшинного введения антитела ADEL-Y01m, мышей с деменцией Tau-P301L, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей подвергали перфузии сердца физиологическим раствором. Затем из них извлекали ткани головного мозга и подвергали иммунопреципитации с помощью белка-G-сепарозы (PGS). После этого проводили вестерн-блоттинг с использованием антитела к IgG мыши. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к Tau5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG, антитела не обнаружили. С другой стороны, определили, что антитело присутствовало в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m (фиг. 40).

Экспериментальный пример 13. Определение эффекта улучшения поведения, обусловленного антителом ADEL-Y01m, в мышинной модели возрастной деменции: внутрибрюшинное введение

Чтобы определить терапевтическую эффективность антитела ADEL-Y01m, получали мышиную модель возрастной деменции таким же образом, как в примере получения 3 с использованием старых мышей возрастом 14 месяцев. Использовали мышиную модель возрастной деменции и антитела ADEL-Y01m, полученные в примере получения 2, вводили ей в соответствии со схемой эксперимента, проиллюстрированной на фиг. 41.

Экспериментальный пример 13.1. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста на построение гнезда.

Тест на построение гнезда, который может определять мультимодальную функцию головного мозга мышей, проводили таким же образом, как в экспериментальном примере 4.1.

В итоге определили, что для мышей с деменцией Tau-P301L показано приблизительно 60% снижение балла построения по сравнению со здоровыми мышами, и что для мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, показан балл построения, аналогичный таковому у здоровых мышей (фиг. 42).

Экспериментальный пример 13.2. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с Y-образным лабиринтом.

Тест с Y-образным лабиринтом проводили так же, как в экспериментальном примере 4.2, для определения восстановления когнитивной функции.

В итоге в случае мышей Tau-P301L время пребывания в зоне А или С составляло приблизительно 80 секунд, что было на приблизительно 25% меньше по сравнению со здоровыми мышами. С другой стороны, в случае мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, время пребывания в зоне А или С составляло примерно 120 секунд, что было аналогично здоровым мышам. На основании этих результатов определили, что способность к кратковременной памяти у мышей с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m восстанавливается (фиг. 43).

Экспериментальный пример 13.3. Определение эффекта улучшения поведения посредством теста с водным лабиринтом.

Тест с подводным лабиринтом проводили так же, как и в эксперименте 4.3.

В итоге на 5-й день проводили оценку времени пребывания в зоне NW, где была помещена платформа. В итоге определили, что мыши Tau-P301L остаются в зоне NW в течение 10 с или меньше, тогда как здоровые мыши и мыши с деменцией Tau-P301L-ADEL-Y01m, которым было введено антитело ADEL-Y01m, остаются в зоне NW в течение 25 с или больше (фиг. 44).

Экспериментальный пример 14. Определение эффекта облегчения таупатии, обусловленного антителом ADEL-Y01m, на мышинной модели возрастной деменции: внутрибрюшинное введение.

Чтобы определить эффект облегчения таупатии после введения антитела ADEL-Y01m, извлекали ткани головного мозга у мышей с возрастной деменцией Tau-P301L, которым были внутрибрюшинно введены IgG или антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей, а также посредством вестерн-блоттинга проверяли уровни экспрессии полного тау-белка (Tau5), ацетилованного тау-белка (Tau-acK280) и фосфорилированного тау-белка (pT231). В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к Tau5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к pT231 (Thermo, MN1040), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS -56077) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге повышенные уровни экспрессии олигомерной формы полного тау-белка, фосфорилированного тау-белка и ацетилованного тау-белка наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG. С другой стороны, значительно сниженные уровни экспрессии полного тау-белка, фосфорилированного тау-белка и ацетилованного тау-белка наблюдали в тканях головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m, по сравнению с тканями головного мозга мышей с деменцией Tau-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG (фиг. 45-48).

Кроме того, извлекали ткани головного мозга мышей с возрастной деменцией Tau-P301L, которым

были внутрибрюшинно введены IgG или антитело ADEL-Y01m в количестве 50 мг/кг, и здоровых мышей, и из них частично выделяли ткани коры головного мозга с использованием муравьиной кислоты. В тканях коры головного мозга нерастворимые агрегаты тау-белка проверяли посредством полуденатурирующего вестерн-блоттинга. В данном случае полуденатурирующий вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 9.

В итоге в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG, наблюдали увеличение содержания нерастворимых агрегатов тау-белка. С другой стороны, в тканях головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым было внутрибрюшинно введено антитело ADEL-Y01m, наблюдали заметное уменьшение содержания нерастворимых агрегатов тау-белка по сравнению с тканями головного мозга мышей с деменцией Тау-P301L, которым был внутрибрюшинно введен IgG (фиг. 49).

III. Определение эффекта ингибирования затравочного действия у антитела к тау-белку.

Экспериментальный пример 15. Определение агрегации тау-белка и затравочного действия у ацетилированного тау-белка.

Сначала осуществляли реакцию тау-белка дикого типа (Тау) с ферментом P300, ацетилтрансферазой, в условиях *in vitro*. Культивируемые нервные клетки обрабатывали ацетилированным тау-белком (Тау-K280-ас), который был подвергнут реакции с P300. Чтобы определить, индуцирует ли ацетилированный тау-белок внутриклеточную агрегацию, проводили обработку ацетилированным тау-белком или тау-белком дикого типа, а также проводили вестерн-блоттинг в отношении лизата донорских клеток с использованием антитела к HA (Sigma-Aldrich, № 11867423001) по истечении 1 ч или 20 ч.

В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к тау5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077), антитело к Р-актину (Sigma, А5441), антитело к HA (Sigma, № 11867423001) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083). В итоге в лизате донорских клеток, обработанных ацетилированным тау-белком, наблюдали повышенную агрегацию полного тау-белка (Тау5) и ацетилированного тау-белка (Тау-асK280) (фиг. 50).

Кроме того, чтобы определить, изменяется ли количество тау-белков, секретируемых из клетки, среды донорских клеток подвергали иммунопреципитации с использованием антитела к HA (Sigma-Aldrich, № 11867423001), а затем проводили вестерн-блоттинг.

В частности, среды донорских клеток центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин для удаления клеточного дебриса. Затем среды донорских клеток обрабатывали с помощью агарозных гранул с белком G (GE Healthcare Life Sciences, Пискатауэй, Нью-Джерси, США) и оставляли для осуществления реакции при 4°C в течение 1 ч. Впоследствии проводили обработку с помощью 1 мкл антитела к HA и реакцию оставляли осуществляться при 4°C на протяжении ночи. На следующий день в нее добавляли сефарозные гранулы с белком G и реакцию оставляли осуществляться при 4°C в течение 1 ч. Затем проводили центрифугирование при 6000 об/мин в течение 1 мин при 4°C для сбора образцов. Каждый из образцов дважды промывали с помощью PBS, содержащего 0,1% Triton X-100. Образец обрабатывали буфером для образцов, а затем проводили вестерн-блоттинг. В данном случае вестерн-блоттинг проводили таким же образом, как и в случае лизата донорских клеток.

В итоге увеличение количества полного тау-белка (Тау5) и ацетилированного тау-белка (Тау-асK280) наблюдали в среде донорских клеток, обработанных ацетилированным тау-белком (фиг. 51).

Кроме того, средой донорских клеток обрабатывали другие нервные клетки (реципиентные клетки) и лизат клеточ-реципиентов собирали по истечении 1 часа или 20 часов. Для каждого образца проводили вестерн-блоттинг с использованием тау-антитела. В данном случае вестерн-блоттинг проводили так же, как в экспериментальном примере 1, и использовали антитело к тау5 (Invitrogen, АНВ0042), антитело к ацетил-K280 (Anaspec, AS-56077), антитело к Р-актину (Sigma, А5441), антитело к HA (Sigma, № 11867423001) и меченное HRP антитело к IgG мыши (Bioxcell, BE0083).

В итоге агрегаты тау-белка наблюдали в лизате реципиентных клеток, обработанных средой донорских клеток (Тау-ас-HA), обработанных ацетилированным тау-белком (фиг. 52 и 53).

Экспериментальный пример 16. Определение эффекта ингибирования затравочного действия тау-белка, обусловленного антителом ADEL-Y01h: *in vitro*.

Чтобы определить эффект ингибирования затравочного действия тау-белка, обусловленный антителом ADEL-Y01h01_v01 в условиях *in vitro*, белковый фрагмент K280-ас (mAC), его агрегат (aAC) или нерастворимую в саркозиле фракцию из тканей головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера вводили в стабильную клеточную систему тау-FRET и измеряли уровень затравочного действия тау-белка. К клеткам, которые обработали затравкой тау-белка, вводили IgG и антитело ADEL-Y01h01_v01 соответственно. Для них проводили сравнительный анализ.

Сначала следующим образом получали агрегат белковых фрагментов K280-ас, который применялся для обработки клеток. Белковые фрагменты K280-ас с концентрацией 25 мкМ растворяли в 25 мМ растворе DTT при температуре 24°C в течение 1 ч и полученный продукт растворяли при перемешивании в растворе (2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES, 10 мМ, pH 7,4), NaCl

(100 мМ) и гепарина (25 мМ) с использованием Eppendorf Thermomixer C при 700 об/мин при температуре 37°C. Таким образом получили агрегат белковых фрагментов K280-ас.

После этого FRET-биосенсор на основе клеток HEK293 Tau-RD P301S (ATCC CRL-3275) распределяли в 96-луночной планшете из расчета $3,5 \times 10^4$ клеток на лунку. Через 18 часов определяли, покрыты ли приблизительно 60% каждой лунки FRET-биосенсором на основе клеток HEK 293 Tau-RD P301S. Затем смешивали 8,75 мкл OPTI-MEM, 1,25 мкл Lipofectamine 2000 (Invitrogen) и белковый фрагмент K280-ас, его агрегат или нерастворимую в саркозиле фракцию, и смесь оставляли для осуществления реакции при комнатной температуре в течение 20 мин. После этого каждую лунку подвергали обработке смесью, а затем проводили инкубацию при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем проводили анализ длины волны флуоресценции с использованием прибора CLARIOstar® (BMGLabtech).

В итоге, в случае введения антитела ADEL-Y01h01_v01 у клеток, обработанных белковым фрагментом K280-ас, проявлялась сниженная суммарная плотность FRET; и в случае введения антитела ADEL-Y01h01_v01 у клеток, обработанных агрегатом белковых фрагментов K280-ас, также проявлялась сниженная суммарная плотность FRET (фиг. 54). Кроме того, в случае введения антитела ADEL-Y01h у клеток, обработанных нерастворимой в саркозиле фракцией из тканей головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, проявлялась сниженная суммарная плотность FRET (фиг. 55). На основании этих результатов определили, что в случае введения антитела ADEL-Y01h01_v01 затравочное действие тау-белка ингибировалось.

Экспериментальный пример 17. Определение эффекта ингибирования затравочного действия тау-белка, обусловленного антителом ADEL-Y01m: *in vivo*.

Чтобы определить эффект ингибирования затравочного действия тау-белка, обусловленный антителом ADEL-Y01m в условиях *in vivo*, были введены внутривенной инъекцией IgG или антителом ADEL-Y01m, начиная за 2 недели до введения нерастворимой в саркозиле фракции от пациентов с болезнью Альцгеймера в слой CA1 левого гиппокампа мышей с деменцией Tau-P301L, полученных в примере получения 3. Нерастворимую в саркозиле фракцию вводили в слой CA1 левого гиппокампа мышей с деменцией Tau-P301L. Впоследствии при умерщвлении из каждой мыши извлекали ткань головного мозга, а затем изготавливали срезы на криотоме. Срезы головного мозга подвергали иммуногистологическому окрашиванию с помощью антитела к AT8 и проверяли уровень затравочного действия тау-белка.

В частности, нерастворимый в саркозиле фрагмент (3 мкл, 3,3 мкг/мкл) из ткани головного мозга пациента с болезнью Альцгеймера на стадии IV по Брааку подвергали ультразвуковой обработке и вводили инъекцией в слой CA1 (передний-задний: -1,9 мм, внутренний-наружный: 1,5 мм, слева: -1,8 мм) левого гиппокампа мышей с деменцией Tau-P301L возрастом 6 месяцев. Мышам с деменцией Tau-P301L были внутривенно введены IgG или антителом ADEL-Y01m в количестве 20 мг/кг/неделю, начиная за 2 недели до введения нерастворимого в саркозиле фрагмента; и мышам внутривенно вводили IgG или антителом ADEL-Y01m один раз в неделю от недели введения нерастворимого в саркозиле фрагмента до недели 12. В данном случае нерастворимый в саркозиле фрагмент вводили со скоростью 0,2 мкл/мин с использованием стеклянного шприца на 10 мкл (Hamilton, 0,49 мм, Рено, Невада, США) и иглу удаляли после 5 минут ожидания перед удалением, чтобы предотвратить обратный поток. Через 12 недель при умерщвлении из каждой мыши извлекали ткань головного мозга и изготавливали замороженные срезы толщиной 30 мкм с использованием Leica CM1860.

Для иммуногистологического окрашивания каждый из срезов головного мозга промывали буфером А (1% NGS, 0,2% Triton X-100 и 30% H₂O₂ и PBS). Срез головного мозга подвергали обработке с помощью PBS, содержащего 1% NGS и 0,2% Triton X-100, и IgG или антителом ADEL-Y01m, и оставляли для осуществления реакции при 4°C на протяжении ночи. Срез головного мозга несколько раз промывали раствором PBS, а затем осуществляли реакцию с вторичным антителом (Vector Laboratories) при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого срез головного мозга подвергали иммунному окрашиванию с использованием набора Vectastain ABC (Vector Laboratories) и иммунное окрашивание проводили в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные срезы мозга анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ (NTH, Бетесда, Мэриленд, США) и проводили количественное определение на трех срезах головного мозга, содержащих гиппокамп. В случае нервных клеток, окрашенных с помощью антитела к AT8, измерения проводили три исследователя в слепом режиме с помощью срезов головного мозга, используемых в эксперименте, и количественный анализ проводили при конкретных пороговых уровнях. Для анализа использовали три среза головного мозга, расположенные в пределах координат от брегма -1,75 до брегма -2,25, от 7 мышей с деменцией Tau-P301L, которым был введен IgG, и 8 мышей с деменцией Tau-P301L, которым было введено антителом ADEL-Y01m. Для статистического анализа использовали t-критерий.

В итоге у мышей с деменцией Tau-P301L, которым был введен IgG, наблюдали сильное окрашивание тел нервных клеток в областях головного мозга (кора, гиппокамп), противоположных стороне, в которую был введен нерастворимый фрагмент от пациента. С другой стороны, у мышей с деменцией Tau-P301L, которым было введено антителом ADEL-Y01m, наблюдали снижение окрашивания в гиппокампе и коре (фиг. 56-59).

Экспериментальный пример 18. Определение эффектов ингибирования агрегации и затравочного действия тау-белка, обусловленных антителом ADEL-Y01m/ADEL-Y01h.

Чтобы определить эффект ингибирования агрегации тау-белка, обусловленный антителом ADEL-Y01m, проводили анализ агрегации тау-белка в условиях *in vitro*. Белковый фрагмент K18, полученный в условиях *in vitro*, ацетилювали путем осуществления реакции с 1,5 мкг P300 и 1 мМ ацетил-КоА при температуре 30°C в течение 3 часов. После этого осуществляли реакцию мономерного белкового фрагмента K18 с 25 мкМ ацетилюванного белкового фрагмента K18 (K18-P301L) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем полученный продукт обрабатывали 25 мМ гепарина 57, HEPES (10 мМ, pH 7,4) и NaCl (100 мМ) и перемешивали в условиях 700 об/мин, чтобы индуцировать агрегацию тау-белков. Затем агрегацию тау-белков и эффект ингибирования их затравочного действия с использованием антитела ADEL-Y01m анализировали посредством вестерн-блоттинга и анализа с тиофлавином-Т. В анализе с тиофлавином-Т определили, что агрегация ацетилюванных тау-белков ингибировалась в случае, когда проводили обработку антителом ADEL-Y01h, по сравнению со случаем, когда ацетилюванные тау-белки агрегировались.

Сначала для реакции образования фибрилл от 10М до 20 М ацетилюванного тау-белка (2N4R) инкубировали при 37°C в растворе, полученном добавлением гепарина (Sigma-Aldrich) и DTT в концентрации 2 мМ в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 7,0). В каждую лунку добавляли раствор белка и ThT (в соотношении 1:1). Измерения при анализе флуоресценции ThT в разные моменты времени проводили с использованием CLARIOstar® (BMG Labtech, Ортенберг, Германия) при длине волны 450 нм (возбуждение) и 510 нм (излучение).

Культивируемые нервные клетки мыши обрабатывали агрегатом ацетилюванных белков и для определения результатов проводили вестерн-блоттинг.

В случае эксперимента первичные нейроны коры головного мозга (DIV10) обрабатывали мономерным K18-P301L, агрегированным K18-P301L или ацетилюванным K18-P301L в концентрации 3 мкг/мл в течение 24 часов. Нейроны предварительно обрабатывали антителом ADEL-Y01m из расчета 3 мкг/мл в течение 30 минут перед обработкой белком K18.

В итоге наблюдали, что множество агрегатов тау-белка проникают в нервные клетки и индуцируют агрегацию собственных тау-белков; однако определили, что в случае одновременной обработки антителом ADEL-Y01m такие явления уменьшаются (фиг. 60 и 61).

Экспериментальный пример 19. Определение защитного эффекта в отношении нервных клеток, обусловленного антителом ADEL-Y01m.

Чтобы определить защитный эффект в отношении нервных клеток, обусловленный антителом ADEL-Y01m, нервные клетки коры головного мозга сначала выделяли из головного мозга мыши в ходе эмбрионального развития. В частности, при умерщвлении из 16-дневной мыши извлекали ткань головного мозга и из нее выделяли кору головного мозга. После этого ткань коры головного мозга иссекали в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), не содержащем кальция и магния, и инкубировали в 0,125% растворе трипсина при 37°C в течение 15 мин. Трипсин инактивировали обработкой модифицированной Дульбекко средой Игла (DMEM), содержащей 20% эмбриональной бычьей сыворотки, и ткань коры головного мозга измельчали с использованием пипетки. Полученную клеточную суспензию разбавляли в среде NB (среда Neurobasal), дополненной добавкой B27 (GibcoBRL), и распределяли в планшете, покрытом поли-D-лизином (Sigma) из расчета 50 мкг/мл и ламинином (GibcoBRL) из расчета 1 мкг/мл. Нервные клетки культивировали при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 10 дней. Затем культивируемые нервные клетки обрабатывали агрегатом ацетилюванных белковых фрагментов K18 из расчета 3 мкг/мл и IgG или антителом ADEL-Y01m и оставляли для осуществления реакции в течение 24 ч.

Через 24 ч супернатант собирали и анализировали с использованием набора для определения цитотоксичности (LDH, Roche Applied Sciences). В качестве колориметрического анализа для количественной оценки клеточной гибели использовали способ измерения активности лактатдегидрогеназы (LDH), которая высвобождается в супернатант из цитозоля поврежденных нервных клеток. Поглощение при длине волны 490 нм измеряли с помощью прибора Tecan Infinite® 200. Результаты выражали в виде процентной доли жизнеспособности клеток по сравнению с отрицательным контролем (холостая проба).

Кроме того, жизнеспособность клеток измеряли с использованием анализа восстановления МТТ (тиазолилового синего тетразолия бромид, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Поглощение при длине волны 540 нм измеряли с использованием прибора TecanInfinite®200, и результаты выражали в виде процентной доли по сравнению с отрицательным контролем (холостая проба).

Кроме того, получали результаты в условиях двух независимых культур и 6 лунок, и все значения выражали как среднее значение ± s.e. среднего. Для статистического анализа использовали однофакторный ANOVA с критерием Тьюки для множественных сравнений.

В итоге, как проиллюстрировано на фиг. 62, в нервных клетках, обработанных IgG, наблюдали высокую активность LDH. С другой стороны, сниженную активность LDH наблюдали в нервных клетках, обработанных антителом ADEL-Y01m, по сравнению с нервными клетками, обработанными IgG. Кроме того, как проиллюстрировано на фиг. 63, в нервных клетках, обработанных IgG, наблюдали сильное

снижение жизнеспособности. С другой стороны, в нервных клетках, обработанных антителом ADEL-Y01m, наблюдали значимое повышение жизнеспособности по сравнению с нервными клетками, обработанными IgG. На основании этих результатов определили, что антитело ADEL-Y01m проявляло защитный эффект против повреждений нервных клеток, вызванных агрегацией ацетилированных тау-белков.

Экспериментальный пример 20. Определение эффекта стимуляции микроглиального фагоцитоза, обусловленного антителом ADEL-Y01m.

Чтобы определить эффект стимуляции микроглиального фагоцитоза, обусловленный антителом ADEL-Y01m, первичную микроглию сначала выделяли из коры головного мозга мышей возрастом 2-3 дня и культивировали в соответствии со способом, описанным в McDonald DR et al., J Neurosci. 1997; 17: 2284-94.

После этого для анализа микроглиального фагоцитоза ацетилированный белковый фрагмент K18 метили с помощью HiLyte™ Fluor 488 в соответствии с инструкциями производителя. Для агрегации ацетилированных белков K18, меченных HiLyte™ Fluor 488, белки соответствующим образом инкубировали при 37°C в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 7,0), содержащем гепарин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 2 мМ DTT, чтобы индуцировать их агрегацию.

Микроглию распределяли в 12-луночный планшет из расчета 5×10^4 клеток/луночка, а затем агрегат ацетилированных белковых фрагментов K18 (3 мкг/мл) оставляли для осуществления реакции при 37°C в течение 2 часов. Предварительную обработку с помощью IgG или антитела ADEL-Y01m в концентрации 4,5 мкг/мл проводили за 30 минут до обработки агрегатом ацетилированных белковых фрагментов K18. Для анализа фагоцитоза клетки отделяли с помощью обработки трипсином, а затем фиксировали с помощью 1% параформальдегида (PFA). Для проточной цитометрии проводили обработку раствором HBSS, содержащим 200 мкл 2% эмбриональной бычьей сыворотки, и анализ проводили с использованием прибора FACSCanto™ II (BD Biosciences) и флуоресцентного фильтра 488.

В итоге у микроглии, обработанной антителом ADEL-Y01m, наблюдали усиленный фагоцитоз по сравнению с микроглией, обработанной IgG (фиг. 64).

Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad (GraphPad Prism v7.0 и GraphPad Prism v8.0, GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Данные анализировали с помощью однофакторного ANOVA (апостериорный критерий Тьюки) и t-критерия Стьюдента. Значимыми считались р-значения менее 0,05.

Номер доступа.

Наименование организации-депозитара: Корейская коллекция типовых культур (КСТС).

Номер доступа: КСТС14155BP.

Дата регистрации материала: 18 марта 2020 г.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варибельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2; и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и варибельную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.
2. Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельная область тяжелой цепи содержит любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-11, и варибельная область легкой цепи содержит любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-15.
3. Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой любые антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из группы, состоящей из антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представ-

ленную под SEQ ID NO: 12;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13;

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14; и

антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента, которые содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 15.

4. Антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где фрагмент является любым фрагментом, выбранным из группы, состоящей из Fab, scFv, F(ab')₂ и Fv.

5. Полинуклеотид, кодирующий антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

6. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.5.

7. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.6.

8. Способ получения антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1, причем способ включает стадию культивирования клетки-хозяина по п.7 и стадию сбора антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина.

9. Полинуклеотид, кодирующий тяжелую и легкую цепь антитела, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, описанные в п.2.

10. Гибридома с номером доступа KCTC 14155BP.

11. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания, причем фармацевтическая композиция содержит в качестве активного ингредиента

антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где дегенеративное неврологическое заболевание представляет собой неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где неврологическое заболевание, опосредованное тау-белком, представляет собой таупатию, первичную возрастную таупатию, хроническую травматическую энцефалопатию, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, лобно-височную деменцию, болезнь Литико-Бодига, паркинсонизм, подострый склерозирующий менингит, свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, ганглиogliому, ганглиоцитому, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Галлервордена-Шпатца или липофусциноз.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера (AD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), группу родственных нарушений, называемых совместно лобно-височной деменцией с паркинсонизмом, сцепленными с хромосомой 17 (FTDP-17), боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), деменцию боксеров (DP), болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера (GSSD), болезнь с тельцами Леви, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ) или болезнь Гентингтона.

15. Фармацевтическая композиция по п.11, где фармацевтическая композиция вводится посредством любого пути введения, выбранного из группы, состоящей из внутримозгового, интрацеребровентрикулярного, внутрибрюшинного, чрескожного, внутримышечного, интрадурального, внутривенного, подкожного и назального путей введения.

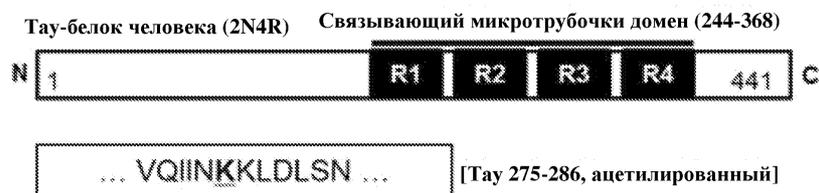
16. Композиция для диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем композиция содержит антитело к тау-белку или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

17. Набор для предупреждения, лечения или диагностики дегенеративного неврологического заболевания, причем набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, полинуклеотид по п.5, вектор экспрессии по п.6 или клетку-хозяина по п.7.

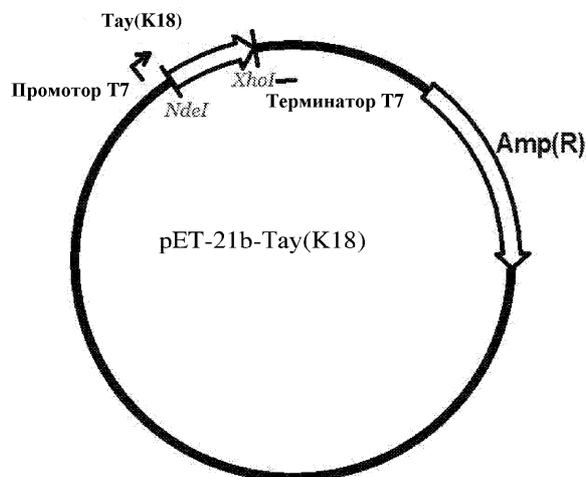
18. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания.

19. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 для получения лекарственного препарата, который применяется для предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания.

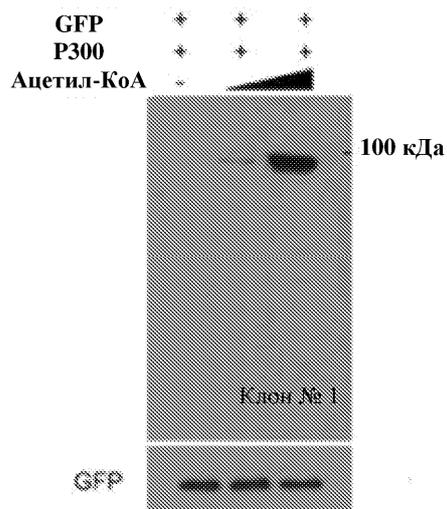
20. Способ предупреждения или лечения дегенеративного неврологического заболевания, причем способ включает введение антитела к тау-белку или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 субъекту, у которого ожидается или в настоящее время имеется дегенеративное неврологическое заболевание.



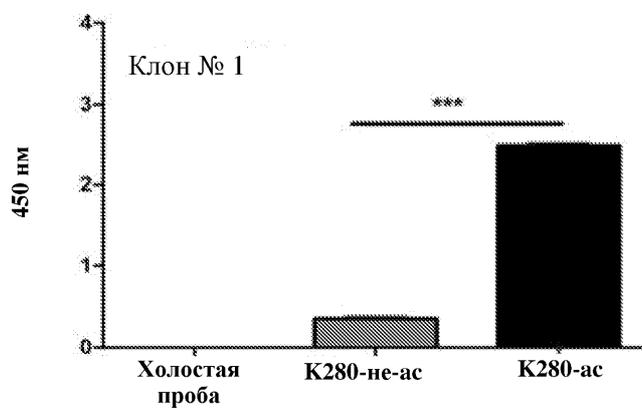
Фиг. 1



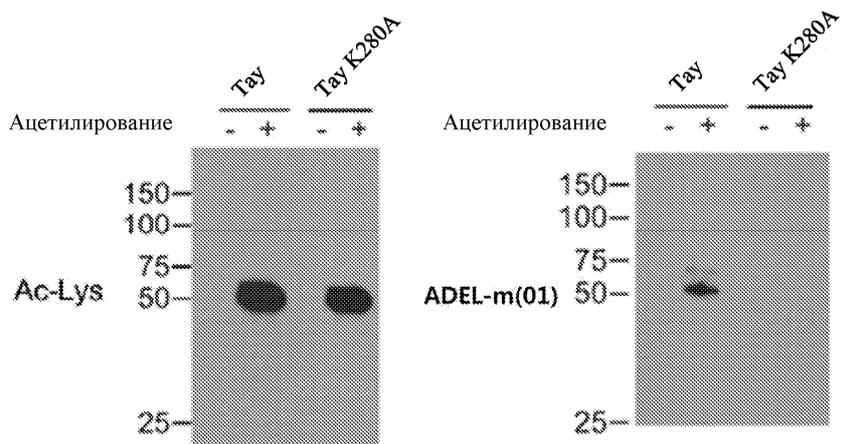
Фиг. 2



Фиг. 3



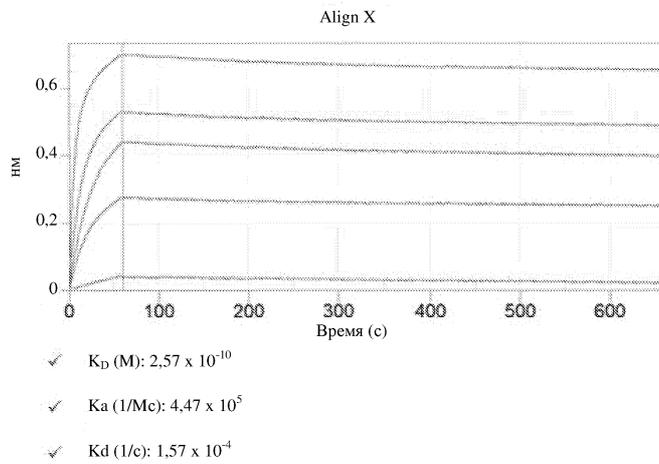
Фиг. 4



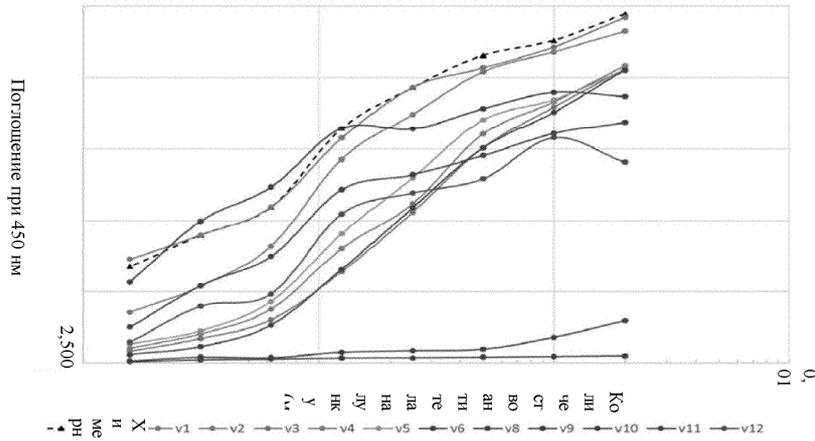
Фиг. 5

Среднее значение		▼ Аб захвата: 1 мкг/лунка
▼ Антиген		ADEL_Y01h01_v01
Антилированный тау-белок	100,00	1,4343
	50,00	1,0622
	25,00	0,5843
	12,50	0,3196
	6,25	0,2274
	0,00	0,1342
Неантилированный тау-белок	100,00	0,2040
	25,00	0,1537
	6,25	0,1559

Фиг. 6

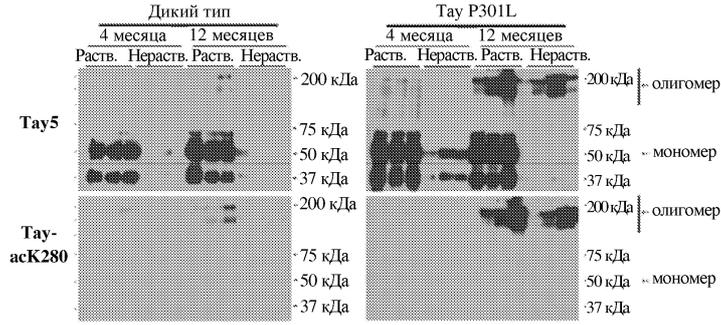


Фиг. 7

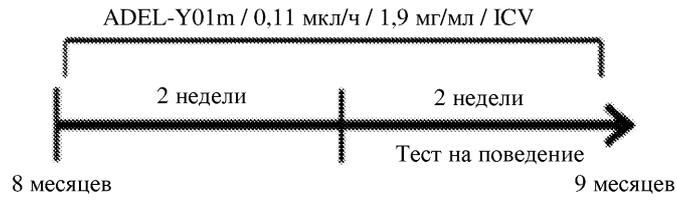


Конц. антитела	v01	v02	v03	v04	v05	v06	v08	v09	v10	v11	v12
2 мкг/лунка	2,421	2,083	2,058	2,324	2,057	2,053	0,2945	1,688	1,8695	0,048	1,408
1 мкг/лунка	2,2155	1,8315	1,793	2,1805	1,847	1,757	0,179	1,6085	1,8985	0,0455	1,5795
0,5 мкг/лунка	2,069	1,6055	1,507	2,041	1,704	1,5075	0,0965	1,4545	1,783	0,0395	1,293
0,25 мкг/лунка	1,9345	1,1205	1,0615	1,744	1,3	1,0925	0,0855	1,322	1,64	0,036	1,1945
0,12 мкг/лунка	1,576	0,805	0,641	1,4285	0,9085	0,6575	0,0745	1,2175	1,645	0,0345	1,0485
0,06 мкг/лунка	1,0965	0,377	0,302	0,822	0,431	0,265	0,0375	0,75	1,2345	0,027	0,4845
0,03 мкг/лунка	0,899	0,2025	0,17	0,537	0,2235	0,1135	0,041	0,5425	0,997	0,0225	0,3975
0,01 мкг/лунка	0,731	0,103	0,0815	0,354	0,131	0,0585	0,015	0,2505	0,568	0,0085	0,145

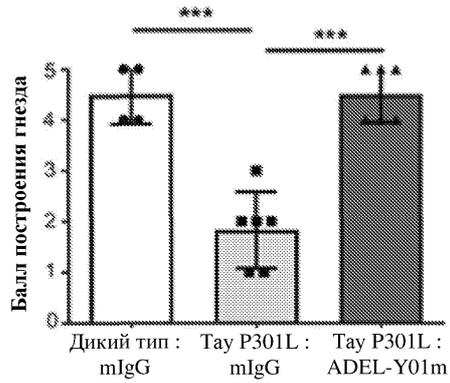
Фиг. 8



Фиг. 9

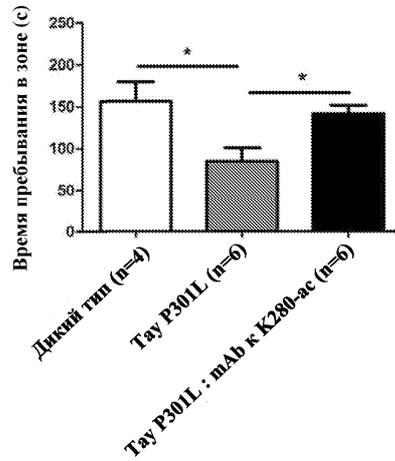


Фиг. 10

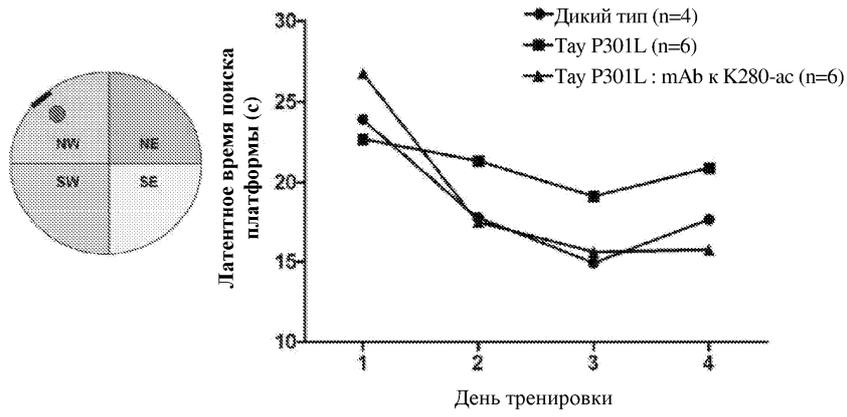


Фиг. 11

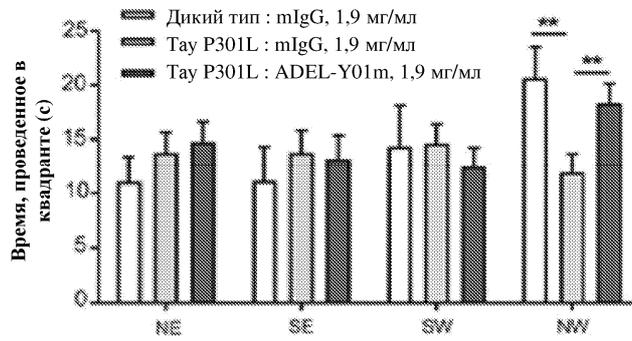
Y-образный лабиринт



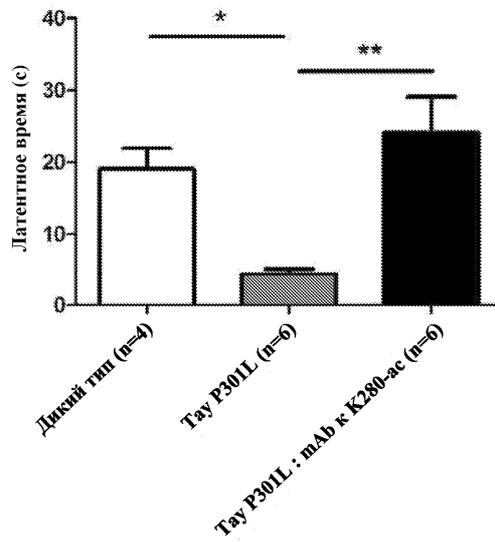
Фиг. 12



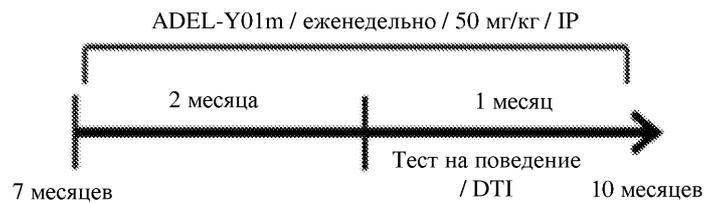
Фиг. 13



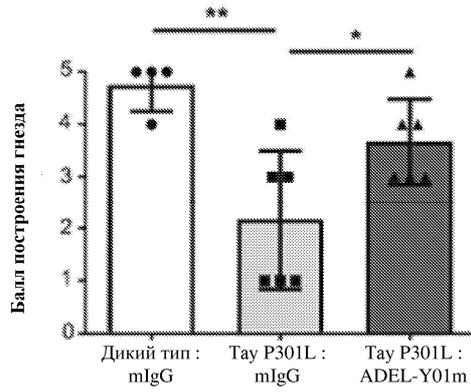
Фиг. 14



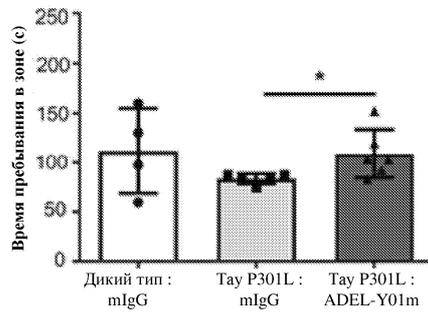
Фиг. 15



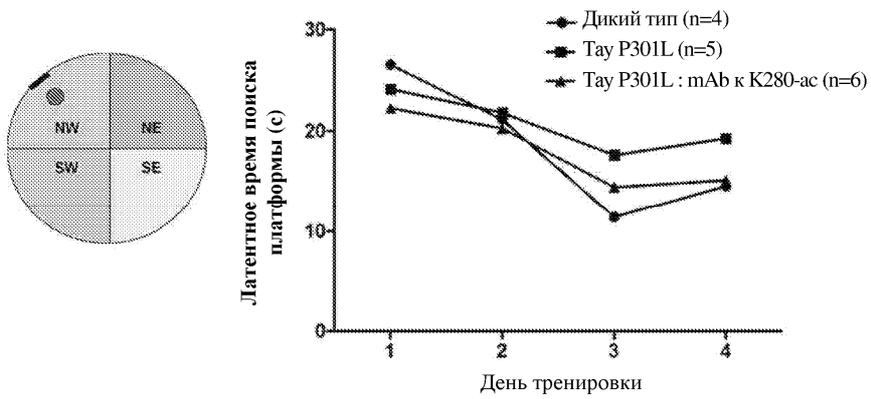
Фиг. 16



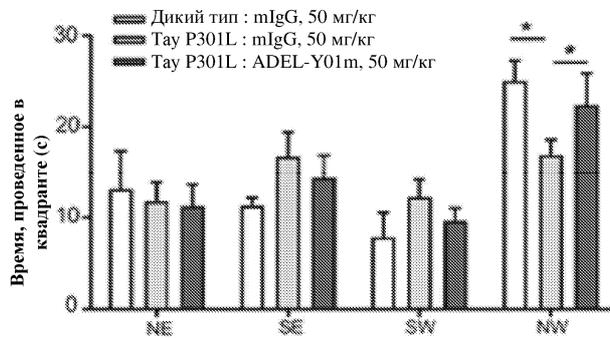
Фиг. 17



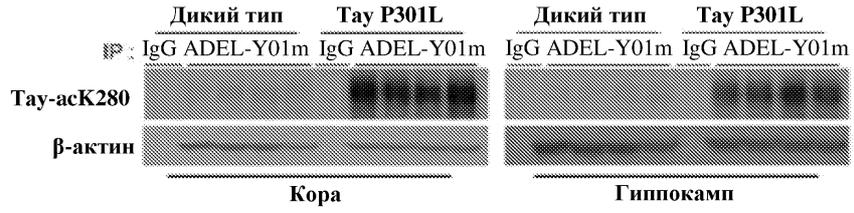
Фиг. 18



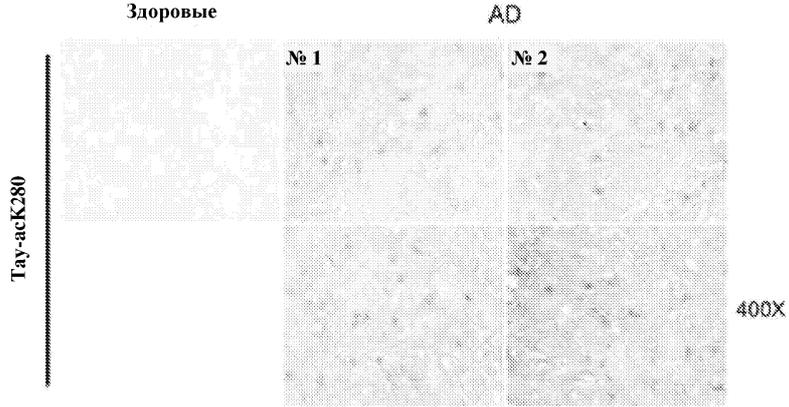
Фиг. 19



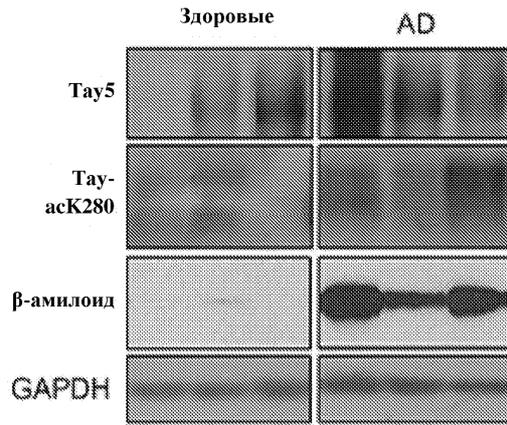
Фиг. 20



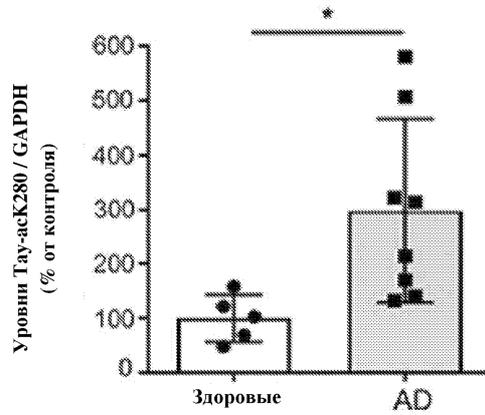
Фиг. 21



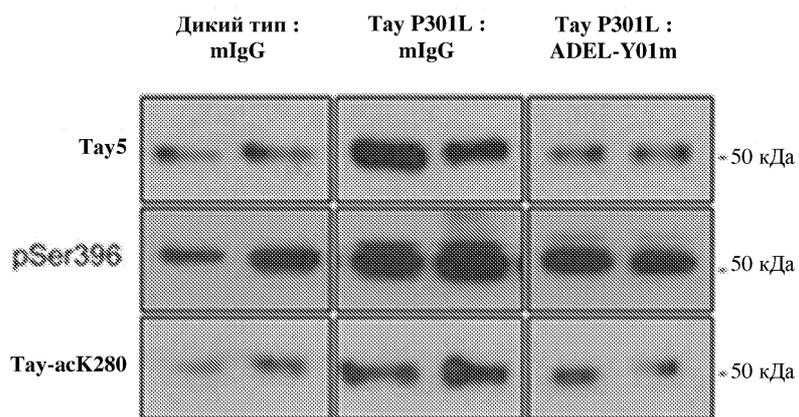
Фиг. 22



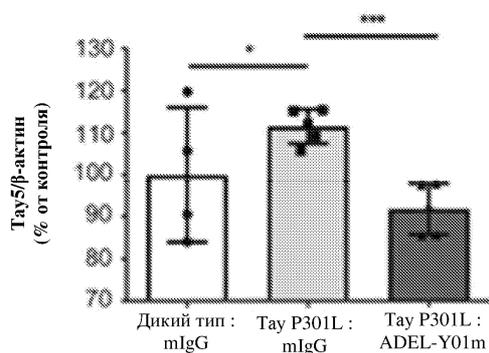
Фиг. 23А



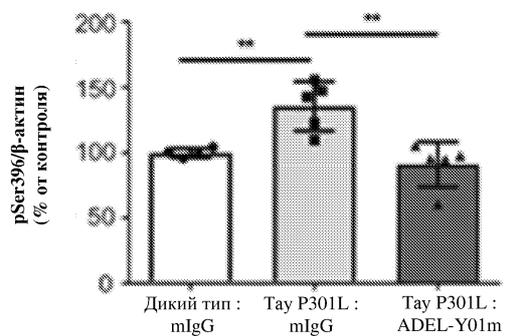
Фиг. 23В



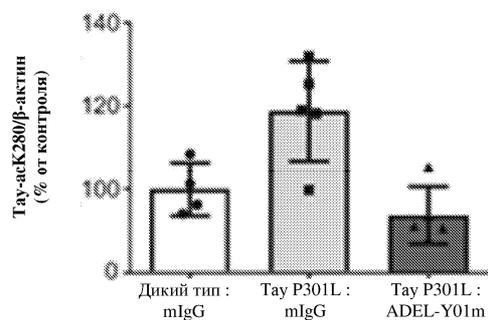
Фиг. 24



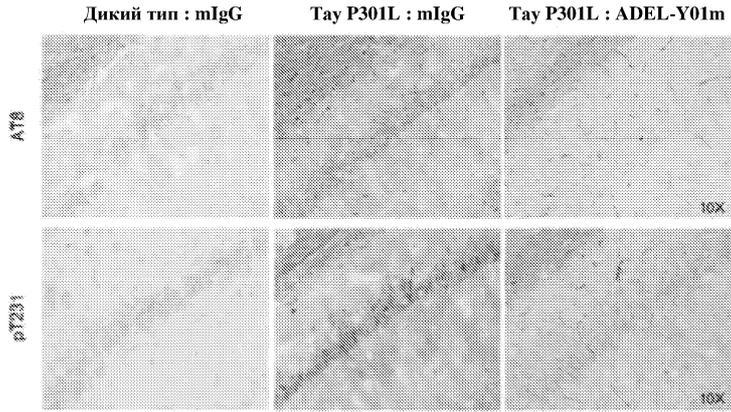
Фиг. 25



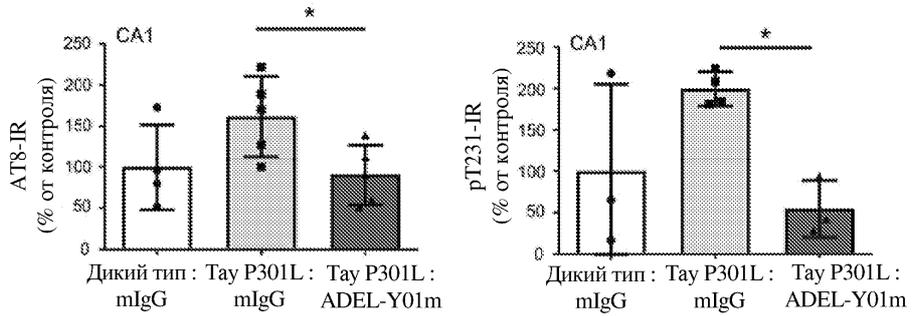
Фиг. 26



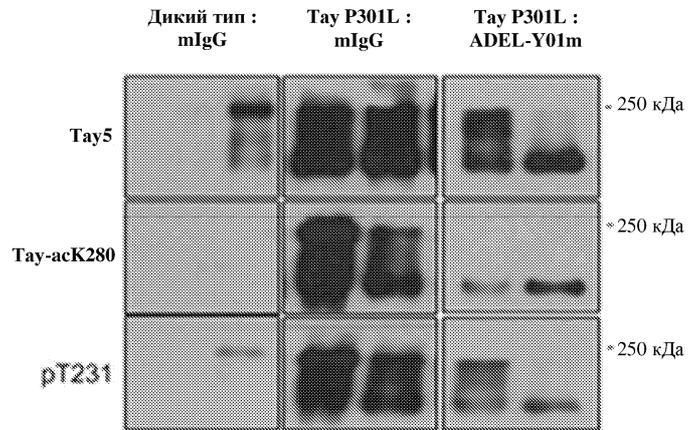
Фиг. 27



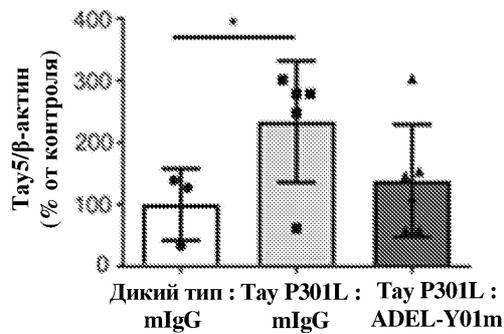
Фиг. 28



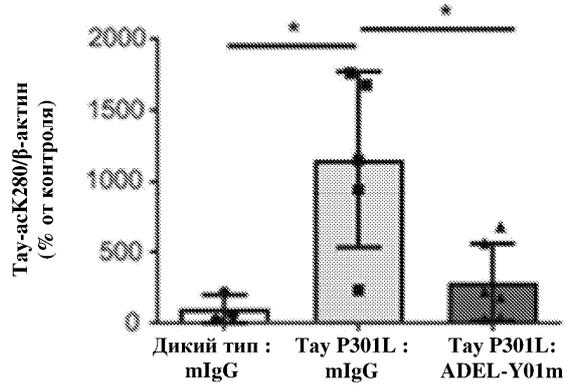
Фиг. 29



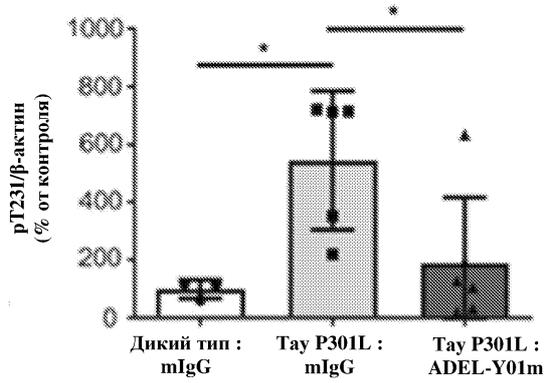
Фиг. 30



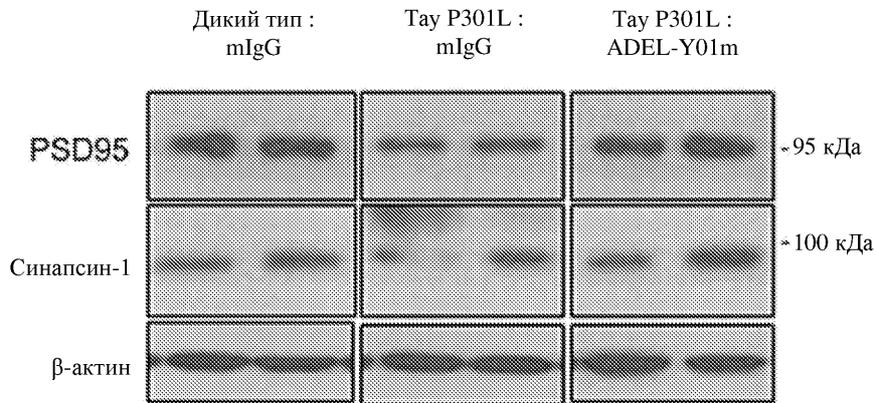
Фиг. 31



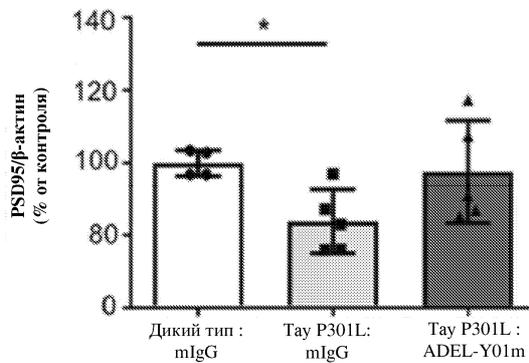
Фиг. 32



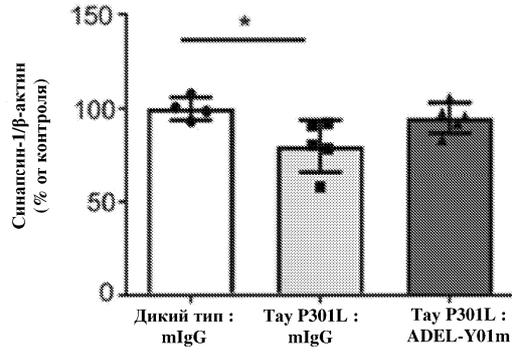
Фиг. 33



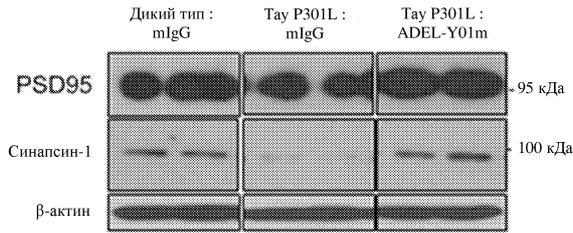
Фиг. 34



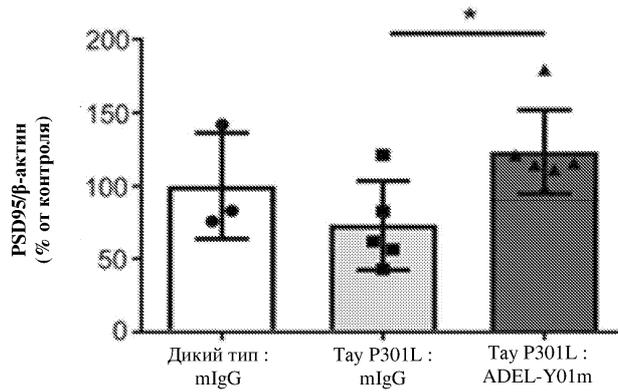
Фиг. 35



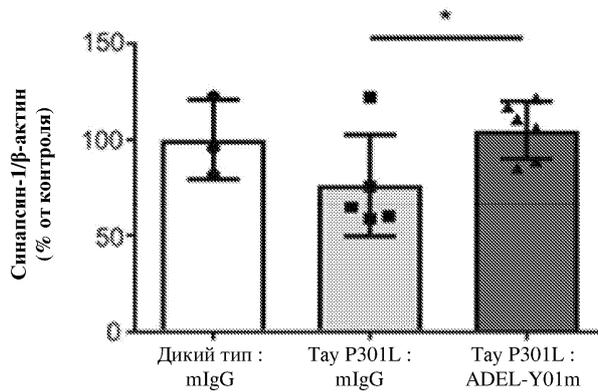
Фиг. 36



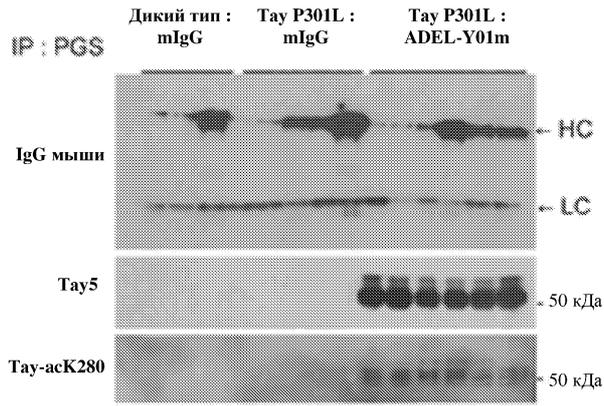
Фиг. 37



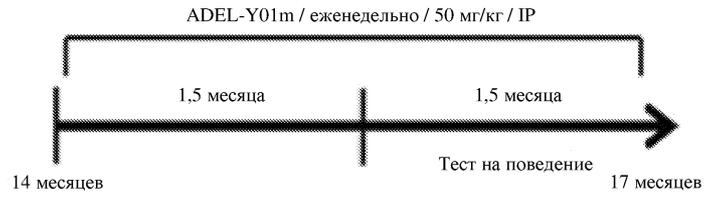
Фиг. 38



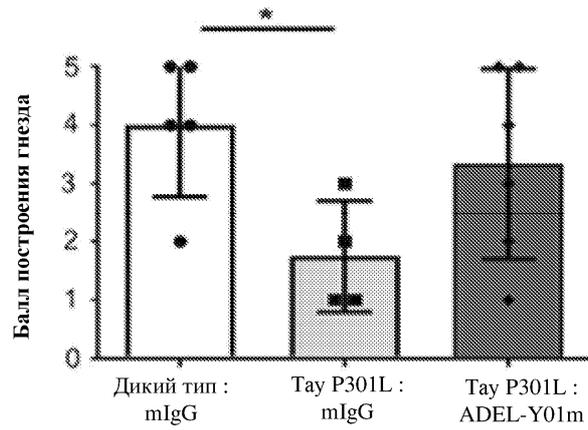
Фиг. 39



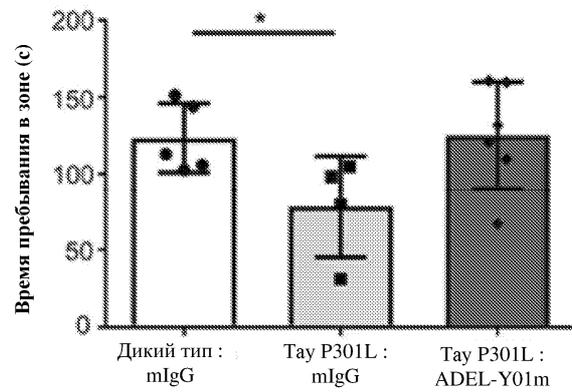
Фиг. 40



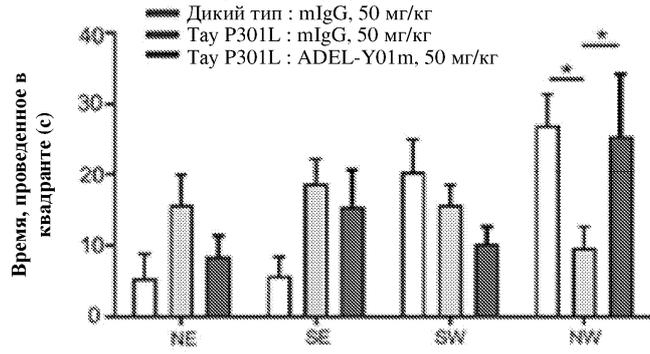
Фиг. 41



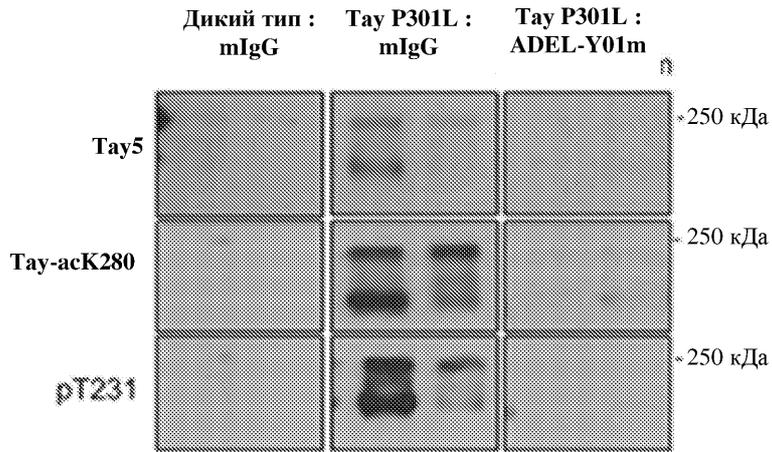
Фиг. 42



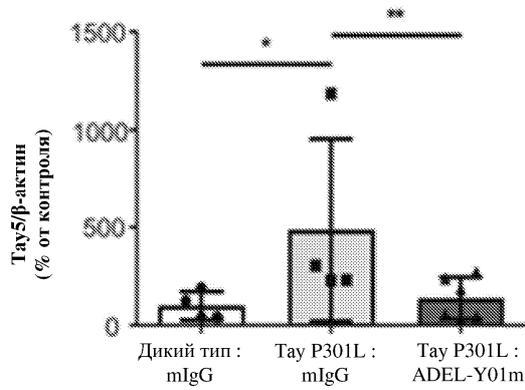
Фиг. 43



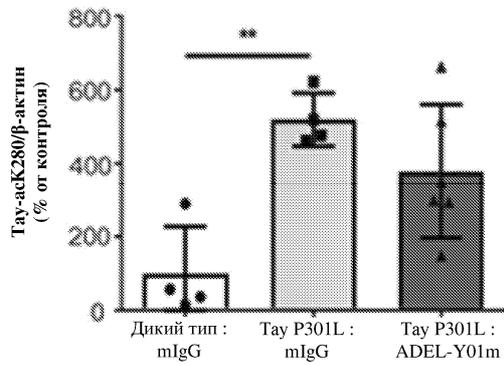
Фиг. 44



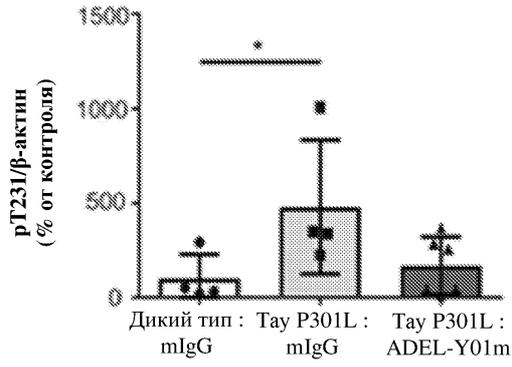
Фиг. 45



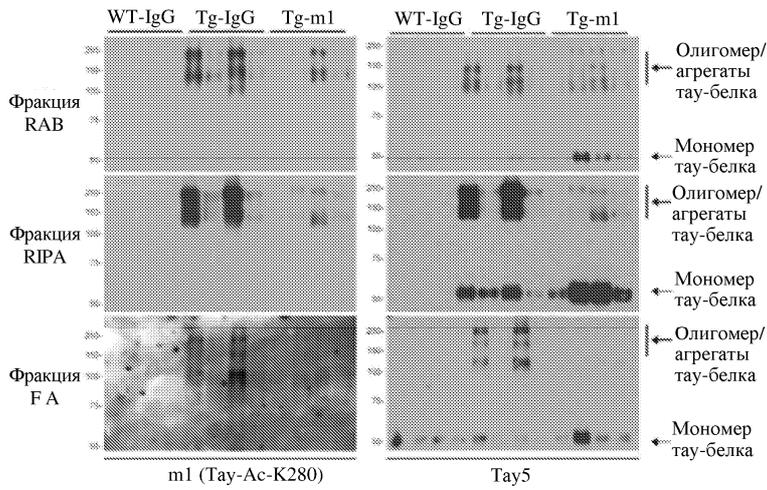
Фиг. 46



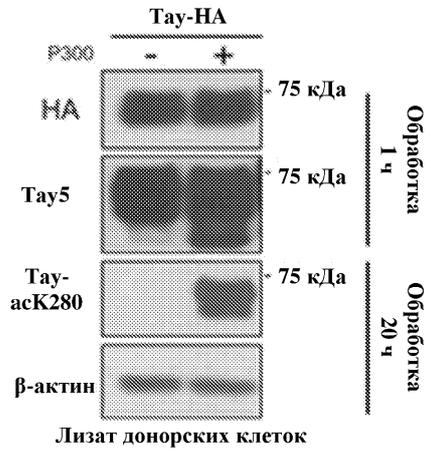
Фиг. 47



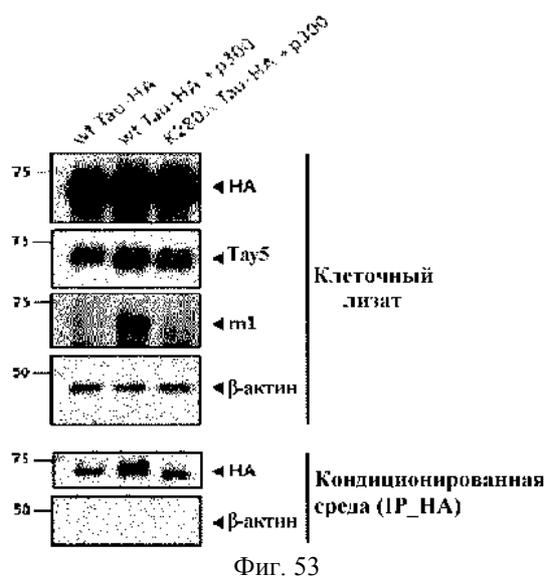
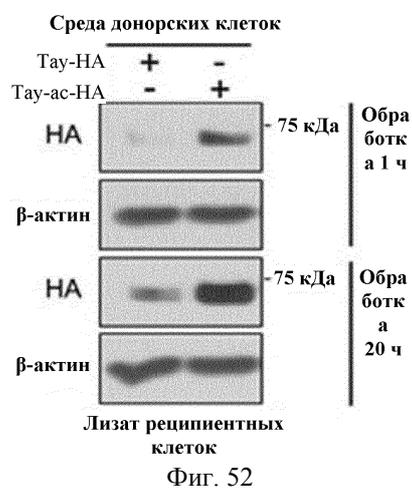
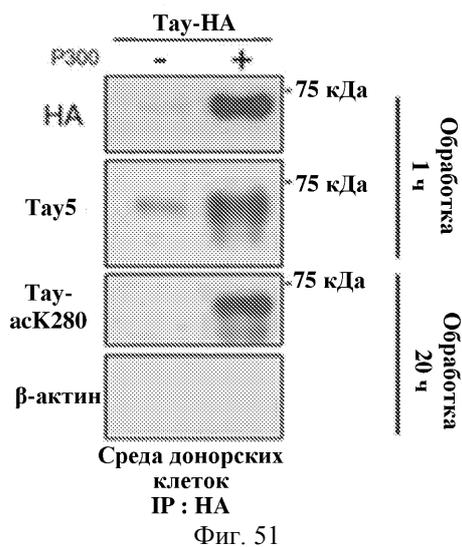
Фиг. 48

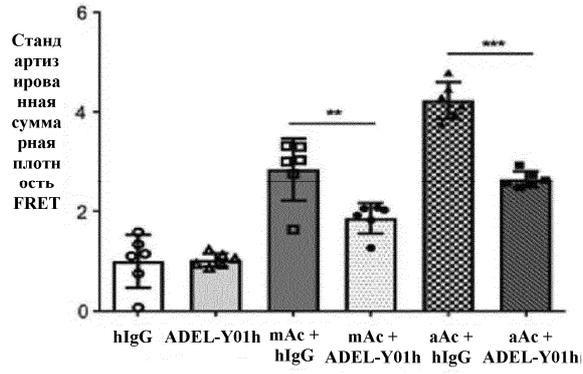


Фиг. 49

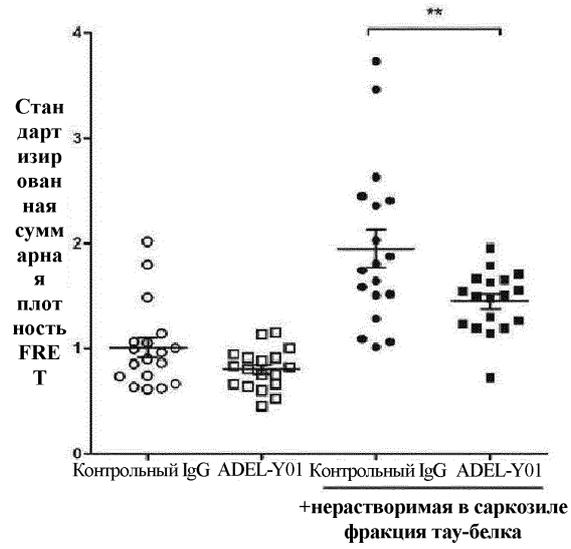


Фиг. 50

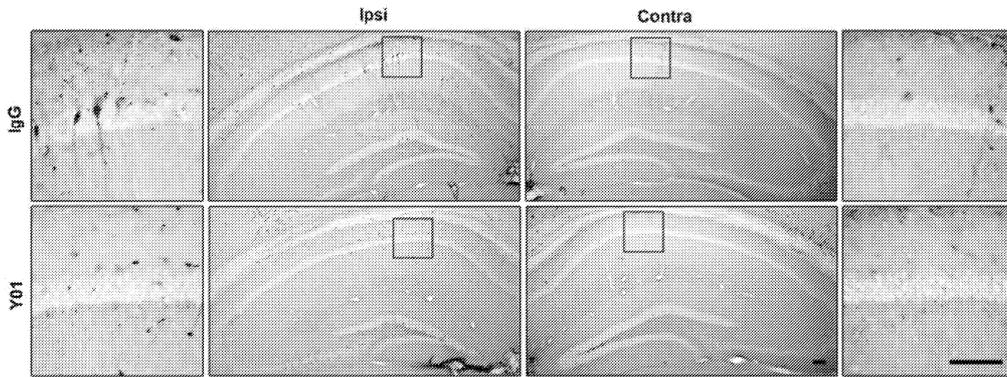




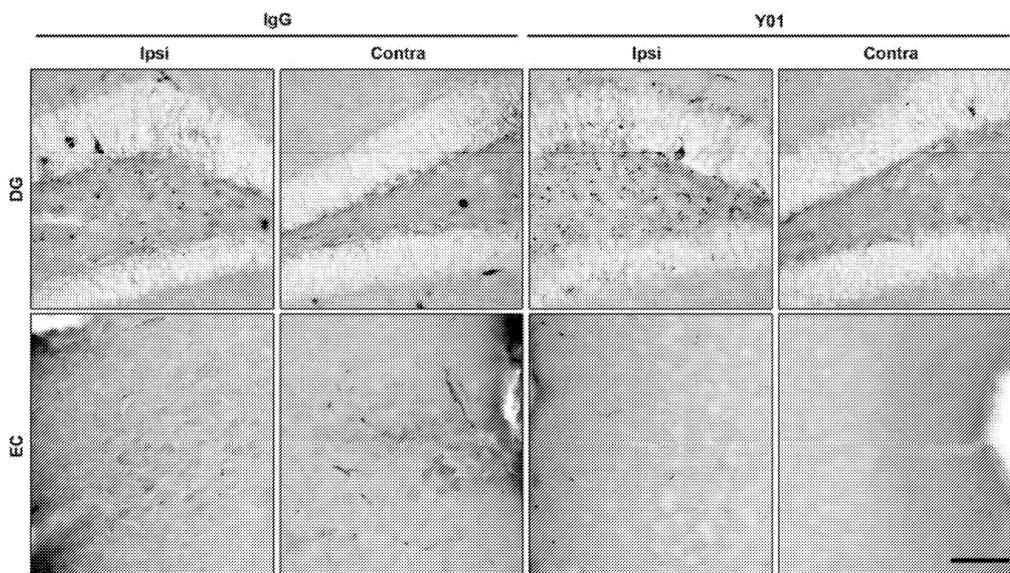
Фиг. 54



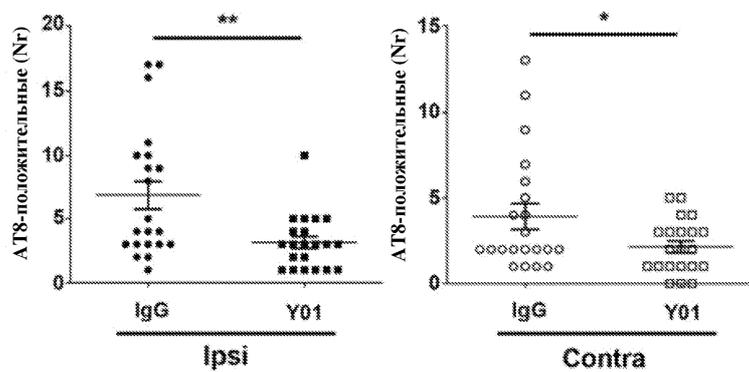
Фиг. 55



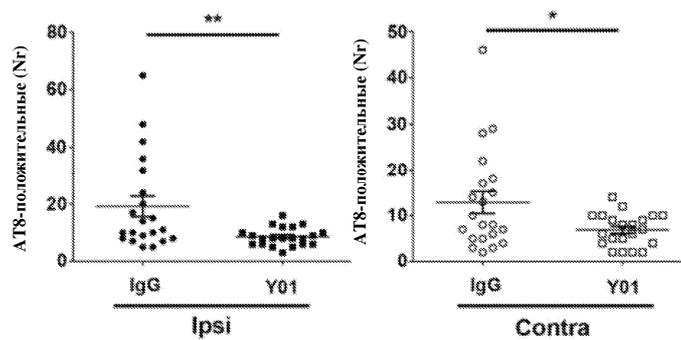
Фиг. 56



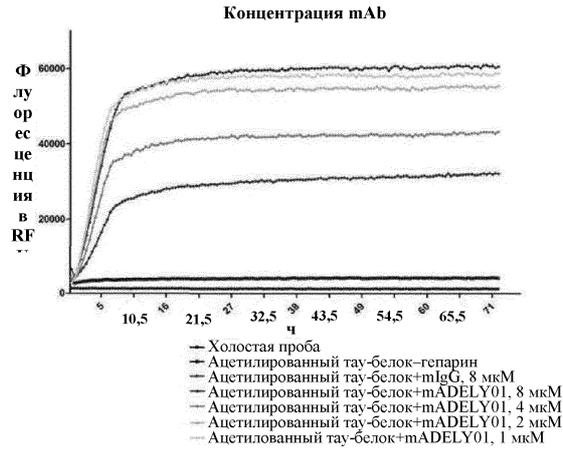
Фиг. 57



Фиг. 58

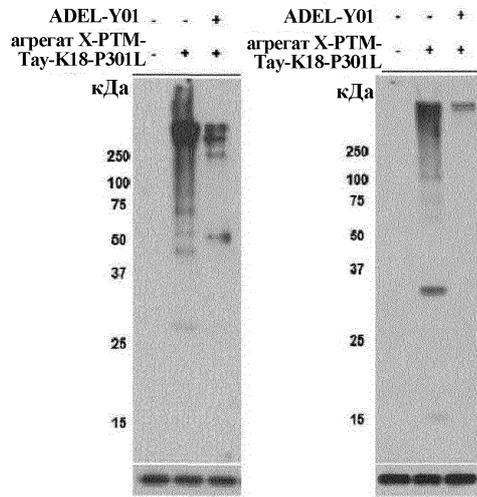


Фиг. 59

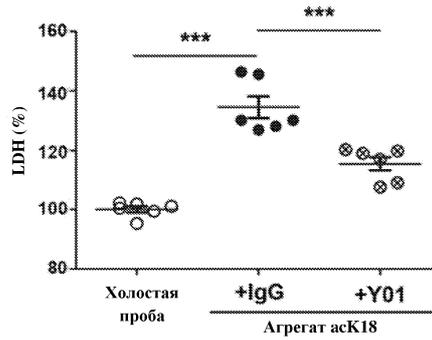


Фиг. 60

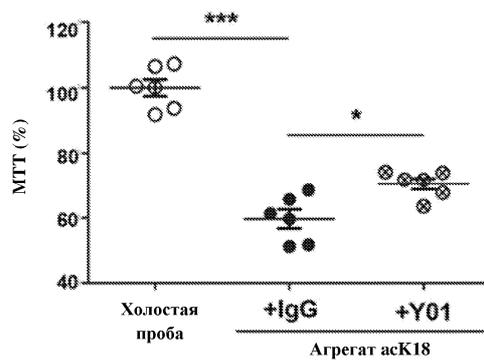
TTC35_полуденатурация ADEL-Y01_полуденатурация



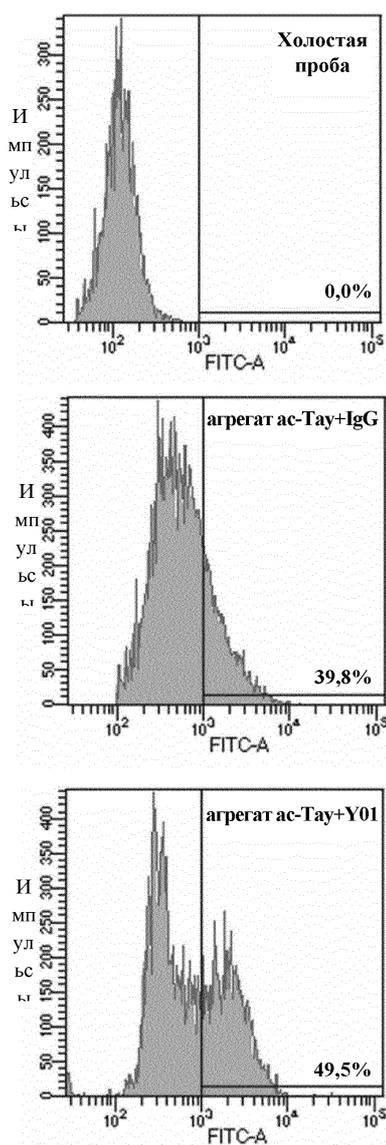
Фиг. 61



Фиг. 62



Фиг. 63



Фиг. 64

