



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123202** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2017 08586</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.02.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.03.2021</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/121,116</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 26.02.2015</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 11.12.2017, Бюл.№ 23</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.03.2021, Бюл.№ 9</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2016/018419, 18.02.2016</p>	<p>(72) Винахідник(и): Альварадо Альберто (US), Драйвер Дейвід (US), Хаясі Мансуо Лу (US), Лу Цзіжон (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2014100600 A2, 26.06.2014 WO 2014059442 A2, 17.04.2014 WO 2012149365 A2, 01.11.2012 Passive Immunization with tau oligomer monoclonal antibody reverses tauopathy phenotypes without affecting hyperphosphorylated neurofibrillary tangles / Castillo-Carranza D. L., Sengupta U., Guerrero-Munoz M. J. et al. // Journal of neuroscience. - 2014. - Vol. 34 (12). - P. 4260-4272 Tau Immunotherapy Modulates Both Pathological Tau and Upstream Amyloid Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model / Castillo-Carranza D. L., Sengupta U., Guerrero-Munoz M. J. et al. // Journal of neuroscience. - 2015. - Vol. 35 (12). - P. 4857 - 4868</p>
---	--

(54) АНТИТІЛО ДО ТАУ-БІЛКА І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується моноклонального антитіла, яке зв'язує людський тау-білок. Також винахід стосується молекули ДНК, клітини ссавця, яка містить молекулу ДНК, способу отримання моноклонального антитіла, яке зв'язує людський тау-білок, фармацевтичної композиції, яка містить заявлене моноклональне антитіло, способу лікування хвороби Альцгеймера, прогресуючого супрануклеарного паралічу та хвороби Піка.

UA 123202 C2

Цей винахід стосується медицини. Зокрема, цей винахід стосується антитіл проти тау-білка, композицій, які містять такі антитіла проти тау-білка, і способів застосування таких антитіл проти тау-білка для лікування нейродегенеративних захворювань, у тому числі хвороби Альцгеймера (AD), прогресуючого супрануклеарного паралічу (PSP) і хвороби Піка (PD).

Тау-білок являє собою білок, який зв'язує мікротрубочки в аксоні, що сприяє об'єднанню та стабільності мікротрубочок. AD та PSP являють собою нейродегенеративні захворювання, які як патології характеризуються аберантною агрегацією тау-білка. Більш конкретно, у разі AD і PSP, як вважають, гіперфосфорильований тау-білок сприяє агрегації нерозчинних фібрил тау-білка, що веде до дестабілізації мікротрубочок і токсичності для нейронів. Дослідження на культурах клітин та мишачих моделях показали, що агрегати тау-білка поширюються через синапси нейронів і секвеструють мономерний (нативний або не агрегований) тау-білок, що індукуює формування агрегатів тау-білка. Нейроанатомічне прогресування агрегації тау-білка і накопичення при нейродегенеративних захворюваннях, таких як AD і PSP, дозволяє зробити припущення про те, що агрегація фібрил тау-білка поширюється уздовж нейронних мереж, призводячи зрештою до дестабілізації мікротрубочок і кінець-кінцем до локалізованого порушення функції нейронів.

Щільність та нейроанатомічна локалізація агрегації тау-білка сильно корелює з неврологічними симптомами AD і PSP та прогресуванням захворювання. Наприклад, у разі AD, тау-білок утворює внутрішньонейронні нейрофібрилярні клубки (NFT), які мають тенденцію до розвитку послідовно з трансенторіальної, до лімбічної і неокортікальної ділянок, і які корелюють з тяжкістю деменції і ступенем втрати нейронів. У разі PSP, агрегація тау-білка спостерігається в нейронах, астроцитах і олігодендроцитах в межах підкіркових і кіркових областей, і було показано, що щільність агрегованого тау-білка корелює з тяжкістю втрати нейронів.

Антитіла проти тау-білка є відомими. Наприклад, в патенті США № 8,926,974 і публікаціях міжнародних заявок №№ WO2011/026031, WO2012/049570 та WO2013/050567 розкриті антитіла проти тау-білка і варіанти використання антитіл проти тау-білка для лікування нейродегенеративних захворювань, таких як AD. Проте наразі немає схваленого для терапевтичного застосування антитіла, мішенню для якого є тау-білок, і на цей час для AD і PSP не існує схваленого способу лікування, який модифікує захворювання. Таким чином, залишається потреба у альтернативних антитілах проти тау-білка. Зокрема, залишається потреба у альтернативних антитілах проти тау-білка, які специфічно зв'язують агрегати тау-білка і які зменшують інтенсивність розвитку формування агрегату тау-білка, формування NFT та втрату нейронів. Перевага віддається таким антитілам проти тау-білка, які також мають хороші фізико-хімічні властивості для полегшення розробки, виробництва та/або одержання лікарських форм.

Цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, яке зв'язує людський тау-білок і яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), при цьому LCVR містить гіперваріабельні ділянки (CDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, а HCVR містить CDR HCDR1, HCDR2 і HCDR3. Відповідно до конкретних варіантів здійснення цього винаходу амінокислотна послідовність LCDR1 представлена послідовністю SEQ ID NO: 3, амінокислотна послідовність LCDR2 представлена послідовністю SEQ ID NO: 4, амінокислотна послідовність LCDR3 представлена послідовністю SEQ ID NO: 5, амінокислотна послідовність HCDR1 представлена послідовністю SEQ ID NO: 6, амінокислотна послідовність HCDR2 представлена послідовністю SEQ ID NO: 7 і амінокислотна послідовність HCDR3 представлена послідовністю SEQ ID NO: 8. У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, яке зв'язує людський тау-білок, що містить LCVR і HCVR, при цьому амінокислотна послідовність LCVR представлена послідовністю SEQ ID NO: 9, а амінокислотна послідовність HCVR представлена послідовністю SEQ ID NO: 10. У ще одному варіанті здійснення цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, яке зв'язує людський тау-білок, що містить легкий ланцюг (LC) і важкий ланцюг (HC), при цьому амінокислотна послідовність LC представлена послідовністю SEQ ID NO: 1, а амінокислотна послідовність HC представлена послідовністю SEQ ID NO: 2.

Цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, яке зв'язує людський тау-білок. У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, яке зв'язує конформаційний епітоп людського тау-білка. У конкретному варіанті здійснення цього винаходу конформаційний епітоп людського тау-білка містить амінокислотні залишки 7-9 та 312-322 людського тау-білка, і при цьому амінокислотна послідовність людського тау-білка представлена послідовністю SEQ ID NO: 13.

Цим винаходом також запропоновані фармацевтичні композиції, які містять моноклональне

антитіло за цим винаходом та один або декілька фармацевтично прийнятний(-их) носій(-ів), розріджувач(-ів) або наповнювач(-ів). Крім того, цим винаходом запропонований спосіб лікування AD, PSP або PD, який включає введення пацієнту, який потребує цього, фармацевтичної композиції за цим винаходом.

5 Крім того, цим винаходом запропонований спосіб лікування нейродегенеративних захворювань. Більш конкретно, цей винахід пропонує спосіб лікування AD, PSP або PD, який включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості моноклонального антитіла за цим винаходом.

10 Цим винаходом також запропоноване моноклональне антитіло за цим винаходом для застосування в терапії. Більш конкретно, цим винаходом також запропоноване моноклональне антитіло за цим винаходом для застосування в лікуванні AD, PSP або PD.

У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропоноване використання моноклонального антитіла за цим винаходом у виробництві лікарського засобу для лікування AD, PSP або PD.

15 Цей винахід також стосується молекул нуклеїнових кислот та векторів експресії, які кодують моноклональне антитіло за цим винаходом. У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1. У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує

20 поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У ще одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонована молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У конкретному варіанті здійснення цього винаходу згадана

25 полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, представлена послідовністю SEQ ID NO: 11, а полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, представлена послідовністю SEQ ID NO: 12.

Далі, цим винаходом запропоноване моноклональне антитіло, одержане у відповідності до способу, який включає культивування клітини-хазяїна, що містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, за таких умов, що моноклональне антитіло експресується, і виділення зі згаданої

30 клітини-хазяїна моноклонального антитіла, що містить LC і HC, при цьому амінокислотна послідовність LC представлена послідовністю SEQ ID NO: 1, а амінокислотна послідовність HC представлена послідовністю SEQ ID NO: 2.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "антитіло" означає молекулу імуноглобуліну, яка містить 2 HC і 2 LC, з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Амінокінцева ділянка кожного LC та HC містить варіабельну ділянку, яка складається з приблизно 100-120

40 амінокислот, яка, перш за все, несе відповідальність за розпізнавання антигену за допомогою CDR, які вона містить. CDR перемижуються більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками ("FR"). Кожна варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) і варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) складається з 3 CDR та 4 FR, які розміщуються у напрямку від аміно-кінця до карбоксильного кінця у такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Згадані 3 CDR легкого ланцюга позначають як "LCDR1, LCDR2 і LCDR3", і 3 CDR важкого ланцюга позначають як "HCDR1, HCDR2 і HCDR3". CDR містять більшість залишків, які утворюють специфічні взаємозв'язки з антигеном. На функціональну здатність антитіла до зв'язування з певним антигеном значною мірою впливають шість CDR. Включення амінокислот до гіперваріабельних ділянок в межах LCVR та HCVR антитіл за цим винаходом

50 має за основу добре відому схему нумерації, яка розроблена Кабатом (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), і на схемі нумерації, яка розроблена Норттом (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).

55 Легкі ланцюги класифікуються як каппа або лямбда, кожен з яких характеризується конкретною константною ділянкою, як відомо у цій галузі. Моноклональні антитіла за цим винаходом включають легкі ланцюги типу каппа. Важкі ланцюги класифікуються як гамма, мю, альфа, дельта або епсилон, і визначають ізотип антитіла як IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, відповідно. Моноклональні антитіла за цим винаходом включають важкі ланцюги IgG. Антитіла

60 IgG можуть бути додатково поділені на підкласи, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

У конкретному варіанті здійснення цього винаходу моноклональні антитіла за цим винаходом являють собою IgG4. Карбокси-кінцева частина кожного важкого ланцюга визначає константну ділянку, яка, перш за все, несе відповідальність за ефекторну функцію. У більш конкретному варіанті здійснення цього винаходу моноклональні антитіла за цим винаходом мають одну або декілька модифікацій у константній ділянці кожного важкого ланцюга, яка(які) зменшує(-ють) ефекторну функцію. У більш конкретному варіанті здійснення цього винаходу моноклональні антитіла за цим винаходом являють собою IgG4, і мають модифікації в константній ділянці обох важких ланцюгів (НС), які знижують ефекторну функцію, в тому числі амінокислоту аланін на обох залишках 230 і 231 (нумерація залишків має за основу ілюстративний НС, який має послідовність SEQ ID NO: 2). У ще більш конкретному варіанті здійснення цього винаходу моноклональні антитіла за цим винаходом являють собою IgG4, і мають модифікації в константній ділянці обох важких ланцюгів, які знижують ефекторну функцію, в тому числі амінокислоту аланін на обох залишках 230 і 231, і мають додаткові модифікації в константній ділянці обох важких ланцюгів, що сприяють стабільності, в тому числі амінокислоту пролін на залишку 224 і делецію амінокислоти лізін на залишку 443 (нумерація залишків має за основу ілюстративний НС, що має послідовність SEQ ID NO: 2).

Антитіла за цим винаходом являють собою моноклональні антитіла ("mAb"). mAb за цим винаходом являють собою повні mAb, що містять 2 важкі ланцюги і 2 легкі ланцюги. Як вказано в цьому описі, mAb являють собою антитіла, які одержані з однієї копії або клону, в тому числі, наприклад, будь-який еукаріотний, прокаріотний або фаговий клон, а не метод, із застосуванням якого їх одержують. Моноклональні антитіла можуть бути одержані, наприклад, шляхом гібридомної технології, рекомбінантної технології, технології фагового дисплею, синтетичної технології, наприклад, шляхом CDR-щеплення, або комбінації таких або інших технологій, відомих в цій галузі.

Способи одержання і очищення антитіл добре відомі в цій галузі, і можуть бути знайдені, наприклад, в Harlow and Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y., розділи 5-8 and 15, ISBN 0-87969-314-2. Наприклад, миші можуть бути імунізовані парними спіральними філаментами ("PHF") людського тау-білка з тканини мозку хворих на AD (Jicha et al., *J. Neurosci. Res.*, 15:48(2), 128-132 (April, 1997)), і одержані антитіла можуть бути виділені, очищені з визначенням амінокислотних послідовностей за допомогою традиційних методів, добре відомих у цій галузі. Моноклональні антитіла за цим винаходом конструюють так, щоб вони містили одну або декілька людських каркасних ділянок, які оточують CDR, що одержані з антитіла, яке не є людським. Послідовності людських каркасних ділянок зародкової лінії можуть бути одержані з ImMunoGeneTics (INGT) через їх сайт, <http://imgt.cines.fr> або з *The Immunoglobulin FactsBook* by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. За конкретними варіантами здійснення цього винаходу конкретні зародкові каркасні ділянки важкого ланцюга і каркасні ділянки легкого ланцюга для використання в моноклональних антитілах за цим винаходом включають 5-51 та A27, відповідно.

У конкретних варіантах здійснення цього винаходу антитіло або нуклеїнову кислоту, що кодує це антитіло, застосовують в ізольованій формі. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "ізольований" означає білок, пептид або нуклеїнову кислоту, який(-а) є вільним(-ою) або практично вільним(-ою) від інших макромолекулярних видів, що знаходяться в клітинному середовищі.

Моноклональні антитіла за цим винаходом можуть бути одержані та очищені із застосуванням відомих методів. Наприклад, послідовності кДНК, що кодують НС (наприклад, амінокислотна послідовність, представлена послідовністю SEQ ID NO: 2) і LC (наприклад, амінокислотна послідовність, представлена послідовністю SEQ ID NO: 1), можуть бути клоновані та включені до вектора для експресії GS (глутамінсинтетаза). Сконструйований вектор для експресії імуноглобуліну може потім бути стабільно трансфектований в клітини CHO. Фахівцю в цій галузі буде зрозуміло, що наслідком експресії антитіл ссавцями буде глікозилування, зазвичай на висококонсервативних сайтах N-глікозилування Fc-ділянки. Стабільні клони можуть бути перевірені на експресію антитіла, що специфічно зв'язується з агрегатами тау-білка. Позитивні клони можуть розмножуватись на безсироватковому культуральному середовищі для продукування антитіл у біореакторах. Середовища, в які секретується антитіло, можуть бути очищені звичайними способами. Наприклад, середовище може бути легко завантажено у колонку з іммобілізованим білком А або колонку з сефарозою (G Sepharose FF), яка була урівноважена сумісним буфером, наприклад, забуференим фосфатом фізіологічним розчином. Колонку промивають для видалення неспецифічних зв'язувальних компонентів. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, градієнтом рН, фракції антитіла

виявляють, наприклад, із застосуванням SDS-PAGE (електрофорез в поліамідному гелі в присутності додецилсульфату натрію), і потім об'єднують. Антитіло може бути сконцентроване та/або відфільтроване за стерильних умов із застосуванням звичайних методів. Розчинні агрегати та мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням звичайних методів, у

5 тому числі із застосуванням гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобної хроматографії, іонообмінної хроматографії або хроматографії на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Продукт може бути негайно заморожений, наприклад, при температурі -70°C, або може бути ліофілізований.

Моноклональні антитіла за цим винаходом можуть бути використані при лікуванні хворих.

10 Більш конкретно, очікується, що антитіла за цим винаходом будуть лікувати клас нейродегенеративних розладів, які називаються таупатіями, що включають AD, PSP та PD. Незважаючи на те, що, як очікується, моноклональні антитіла за цим винаходом будуть прийнятними при лікуванні AD, PSP та PD, такі антитіла також можуть бути прийнятними при лікуванні інших таупатій, у тому числі хронічної травматичної енцефалопатії. У значенні,

15 взаємозамінно вживаному у цьому описі, терміни "лікування" та/або "лікувати" стосуються всіх процесів, при яких може бути уповільнення, переривання, затримання, регулювання, зупинення або зворотного прогресування розладів, наведених у цьому описі, але не обов'язково вказують на повне усунення всіх симптомів розладу. Лікування включає введення антитіла за цим винаходом для лікування захворювання або хворобливого стану у людини, для якої було б

20 корисним зменшення інтенсивності розвитку формування щонайменше одного агрегату тау-білка, формування NFT та втрати нейронів, і включає: (a) інгібування подальшого прогресування хвороби, тобто затримку її розвитку; і (b) ослаблення захворювання, тобто спричинення регресу захворювання або розладу чи полегшення їх симптомів або ускладнень.

У значенні, взаємозамінно вживаному у цьому описі, термін "пацієнт", "суб'єкт" і "індивід" означає людину. У деяких варіантах здійснення цього винаходу пацієнт додатково характеризується захворюванням, розладом або станом (наприклад, нейродегенеративним розладом), при якому було б корисним зменшення інтенсивності розвитку формування щонайменше одного агрегату тау-білка, формування NFT та втрати нейронів. У іншому варіанті здійснення цього винаходу пацієнт характеризується як такий, що знаходиться під загрозою

25 розвитку нейродегенеративного розладу, захворювання або стану, при якому було б корисним зменшення інтенсивності розвитку формування щонайменше одного агрегату тау-білка, формування NFT та втрати нейронів.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "зв'язується з тау-білком (або зв'язує тау-білок)" означає взаємодію антитіла з епітопом агрегату людського тау-білка. Найбільшу перевагу віддають епітопу, який являє собою конформаційний епітоп людського тау-білка. В конкретному

35 варіанті здійснення цього винаходу термін "зв'язується з тау-білком (або зв'язує тау-білок)" означає взаємодію з конформаційним епітопом, що містить амінокислотні залишки 7-9 і 312-322 агрегату людського тау-білка (нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має послідовність SEQ ID NO: 13). Слід розуміти, що існують відомі варіації людського тау-білка, наприклад, такі, які є наслідком варіантів сплайсингу. Такі відомі варіації, однак, мають конформаційний епітоп, що містить амінокислотні залишки 7-9 і 312-322 послідовності SEQ ID NO: 13. Однак відомі варіанти можуть бути результатом зміненої нумерації амінокислотних залишків 7-9 і 312-322 послідовності SEQ ID NO: 13. Хоча в деяких варіантах нумерація залишків може бути змінена, амінокислоти, що містять епітоп, залишаються незмінними. Термін "епітоп" у значенні, вживаному у цьому описі, означає дискретні тривимірні сайти антигену, які розпізнаються моноклональними антитілами за цим винаходом.

40

45

Моноклональне антитіло за цим винаходом може бути введено у фармацевтичну композицію, яку можна приготувати методами, добре відомими в цій галузі, і яка містить моноклональне антитіло за цим винаходом та один або декілька фармацевтично прийнятний(-их) носій(-ів) та/або розріджувач(-ів) (наприклад, довідник Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, який містить стислий опис методів одержання лікарських форм, які загалом відомі для практиків). Прийнятні носії для фармацевтичних композицій охоплюють будь-який матеріал, який, у поєднанні з моноклональним антитілом за цим винаходом, зберігає активність молекули і не взаємодіє з імунною системою пацієнта.

50

55

Фармацевтична композиція, що містить моноклональне антитіло за цим винаходом, може бути введена пацієнту, який знаходиться під загрозою виникнення наведених в цьому описі захворювань або розладу або має наведені в цьому описі захворювання або розлад, парентеральними шляхами (наприклад, підшкірним, внутрішньовенним, внутрішньочеревинним, внутрішньом'язовим або черезшкірним). Фармацевтична композиція за цим винаходом містить

60

"ефективну" або "терапевтично ефективну" кількість, у значенні, взаємозамінно вживаному у цьому описі, моноклонального антитіла за цим винаходом. Термін "ефективна кількість" означає кількість (у дозах і для проміжків часу та для способу введення), необхідну для досягнення бажаного терапевтичного результату. Ефективна кількість моноклонального антитіла може

варіювати відповідно до певних факторів, таких як стан захворювання, вік, стать і маса людини,

та здатність моноклонального антитіла до спричинення бажаної відповіді у людини. Ефективною кількістю є також така кількість, при якій будь-який токсичний або шкідливий вплив моноклонального антитіла за цим винаходом є меншим за терапевтично сприятливий вплив.

Генно-інженерне антитіло проти тау-білка

При конструюванні моноклонального антитіла проти тау-білка за цим винаходом виникли значні труднощі, пов'язані з хімічною та фізичною стабільністю. Труднощі, які виникли, охоплюють низьку зв'язувальну спорідненість, імуногенність, агрегацію, димеризацію HC, а також деамідування, окиснення, ізомеризацію та помилкове згортання варіабельної ділянки.

Наприклад, мишаче антитіло IgG1, MC-1 ("MC-1") (Albert Einstein College of Medicine, Jicha et al., 1997), яке розпізнає конформаційний епітоп тау-білка на амінокислотних залишках 7-9 та 312-322 (нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13), спочатку було гуманізоване введенням трьох CDR HC мишачого MC-1 у декілька генів зародкової лінії каркасу людського HC та трьох CDR LC мишачого MC-1 у декілька генів зародкової лінії каркасу людського LC. У гуманізованих генно-інженерних антитілах MC-1 використали 96 різних комбінацій каркасів важких та легких ланцюгів, які є представниками кожної з дванадцяти родин зародкових ліній каркасу HC (специфічні каркаси людського HC: 1-24, 1-46, 1-69, 2-05, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51 та 6-01) і кожну з восьми родин зародкових ліній каркасу LC (специфічні каркаси людського LC: A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12, O11 і O-2). Відповідні гени зародкової лінії каркасу клонували у вектори експресії важкого і легкого ланцюга людського IgG₄, і трансфекували у клітини HEK293 для експресії та дослідження зв'язування із застосуванням ELISA. Незважаючи на те, що числені каркасні пари демонстрували певний рівень зв'язування з тау-білком при проведенні ELISA, одержані генно-інженерні антитіла продемонстрували низьку проблем, в тому числі низьку зв'язувальну спорідненість, агрегацію, димеризацію HC, і проблеми, пов'язані з хімічною

стійкістю, такі як деамідування, окиснення та ізомеризація варіабельних ділянок.

Тому для одержання антитіл проти тау-білка, що мають поліпшену зв'язувальну спорідненість, ліквідовану або зменшену димеризацію HC, знижену імуногенність та підвищену хімічну та фізичну стабільність, були розроблені модифікації. Амінокислотні модифікації (відносно MC-1, Jicha et al., 1997) були розроблені в HCDR2 і HCDR3, а також в LCDR1, LCDR2 та LCDR3. Модифіковане мишаче антитіло гуманізували введенням трьох CDR HC у декілька генів зародкової лінії каркасу людського HC та трьох CDR LC у декілька генів зародкової лінії каркасу людського LC. Крім того, були проведені екстенсивні дослідження стабільності білка, і генно-інженерні моноклональні антитіла були піддані скринінгу на властивості експресії та термостійкості, а також властивості зв'язувальної спорідненості. Моноклональне антитіло, що містить сім мутацій CDR (амінокислотна позиція має за основу нумерацію лінійного амінокислотного залишку ілюстративного антитіла за цим винаходом, наведеного в Таблиці 1: HCDR2 на N61E і E62K; HCDR3 на P103V і Y105D; LCDR1 на G34Q; LCDR2 на S57D і LCDR3 на H98L), було ідентифіковане як таке, що підвищує зв'язувальну спорідненість, хімічну і фізичну стабільність та імуногенність моноклональних антитіл за цим винаходом (відносно MC-1, Jicha et al., 1997). Жодна з перерахованих вище модифікацій не була ідентифікована в ознаках генно-інженерного антитіла MC-1 або генно-інженерного гуманізованого антитіла MC-1.

Ілюстративне генно-інженерне моноклональне антитіло проти тау-білка за цим винаходом представлено в Таблиці 1. Це ілюстративне генно-інженерне моноклональне антитіло проти тау-білка містить каркас 5-51 людського HC і каркас A27 людського LC. Взаємозв'язок різних ділянок ілюстративного генно-інженерного моноклонального антитіла проти тау-білка виглядає так (в нумерації амінокислот застосовується лінійна нумерація; розподіл амінокислот до варіабельних доменів базується на Міжнародній інформаційній системі імуногенетики (International Immunogenetics Information System®), доступний на www.imgt.org; розподіл амінокислот до CDR-доменів має за основу добре відому схему нумерації, яка розроблена Нортон, за винятком HCDR2, який має за основу добре відому схему нумерації, яка розроблена Кабатом):

Таблиця 1:

Амінокислотні ділянки ілюстративного генно-інженерного моноклонального антитіла проти тау-білка за цим винаходом.

SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:1		
HCVR	Ділянка	Позиції	LCVR	Ділянка	Позиції
	FRH1	1-22		FRL1	1-23
	HCDR1	23-35		LCDR1	24-39
	FRH2	36-49		FRL2	40-53
	HCDR2	50-66		LCDR2	54-61
	FRH3	67-96		FRL3	62-93
	HCDR3	97-105		LCDR3	94-102
	FRH4	106-116		FRL4	103-112
Константна	CH	117-442	Константна	CL	113-219

Наведені нижче Приклади і дослідження доводять, що моноклональні антитіла за цим винаходом є придатними для лікування пов'язаних з поширенням агрегатів тау-білка нейродегенеративних розладів, таких як AD, PSP або PD. Однак слід розуміти, що наведені нижче Приклади є ілюстративними, а не обмежувальними, і що фахівцем у цій галузі можуть бути внесені різні модифікації.

Приклади

Експресія генно-інженерного антитіла проти тау-білка

Генно-інженерні моноклональні антитіла проти тау-білка за цим винаходом можуть бути експресовані та очищені по суті так, як описано нижче. Експресійний вектор для експресії глутамінсинтетази (GS), що містить ДНК-послідовність SEQ ID NO: 11 (що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 LC) та ДНК-послідовність SEQ ID NO: 12 (що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 HC), використовується для трансфекції лінії клітин яєчника китайського хом'яка (CHO) шляхом електропорації. Вектор експресії кодує промотор мавпячого вірусу SV Early (Simian Virus 40E) і ген GS. Експресія GS робить можливим біохімічний синтез глутаміну, амінокислоти, необхідної клітинам CHO. Після трансфекції клітини піддають змішаній селекції з 50 мкМ розчином L-метіонінсульфоксими́ну (MSX). Інгібування GS із застосуванням MSX застосовують для підвищення жорсткості селекції. Клітини з інтеграцією кДНК експресійного вектору в транскрипційно активні ділянки генома клітини-хазяїна можуть бути відібрані проти клітин CHO дикого типу, які експресують ендогенний рівень GS. Трансфектовані пули висівають з низькою щільністю, щоб надати можливість близького до клонального росту стабільних експресуючих клітин. Еталонні лунки піддають скринінгу на експресію антитіл, і потім масштабують в безсироваткових суспензійних культурах, які використовують для продукування. Просвітлене середовище, в яке секретується антитіло, завантажують на афінну колонку з іммобілізованим білком А, яка була врівноважена сумісним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин (рН 7,4). Колонку промивають 1М розчином NaCl для видалення неспецифічних зв'язувальних компонентів. Зв'язане моноклональне антитіло проти тау-білка елюють, наприклад, цитратом натрію при рН (приблизно) 3,5, а фракції нейтралізують 1М трис-буфером. Виявляють фракції з моноклональним антитілом проти тау-білка, наприклад, за допомогою SDS-PAGE або аналітичної гель-хроматографії за розміром молекул, які у подальшому об'єднують. Розчинні агрегати та мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням звичайних методів, у тому числі із застосуванням гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобної хроматографії, іонообмінної хроматографії або хроматографії на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Моноклональне антитіло проти тау-білка за цим винаходом концентрують, та/або фільтрують за стерильних умов із застосуванням звичайних методів. Чистота моноклонального антитіла проти тау-білка після цих етапів хроматографії становить більше ніж 95 %. Моноклональне антитіло проти тау-білка за цим винаходом може бути негайно заморожене при температурі -70 °C або зберігатись при температурі 4 °C протягом декількох місяців.

Кінетика і спорідненість зв'язування

Для визначення зв'язування ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 як з людським мономерним (наприклад, нативним або неагрегованим) тау-білком, так і з агрегатами людського тау-білка (обидва з яких мають амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO:13), застосовують дослідження поверхневого

плазмонного резонансу (SPR) з визначенням із застосуванням приладу BIACORE® 2000 (праймованого HBS-EP+рухомий буфер (компанія GE Healthcare, 10 mM HEPES, pH 7,4+150 mM розчин NaCl+3 mM розчин EDTA+0,05 % поверхнево-активного P20) при температурі 25°C). Зв'язування гуманізованого генно-інженерного антитіла MC-1 (що має комбінацію каркасів: 5-51 важкого ланцюга, A27 легкого ланцюга) з людським мономерним тау-білком і агрегатом людського тау-білка визначають аналогічним чином.

Крім тих випадків, коли це зазначено, всі реагенти та матеріали є від компанії BIACORE® AB (Uppsala, Швеція). Для застосування методу захоплення, на всіх чотирьох проточних кюветах (FK) використовують чіп CM5, що містить іммобілізований білок A (одержаний шляхом стандартного сполучення аміногруп із застосуванням активації за допомогою NHS-EDC). Зразки антитіла готують з концентрацією 0,5 мкг/мл шляхом розведення у рухомому буфері. Мономерний тау-білок і фібрилярний тау-білок готують з концентрацією 2000 нМ, 1000 нМ, 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ, 31,25 нМ, 15,63 нМ, 7,82 нМ, 3,91 нМ, 1,95 нМ і 0 нМ (контроль) шляхом розведення у рухомому буфері. Кожен цикл дослідження складається з: (1) іммобілізації зразків антитіла на окремих проточних кюветах (FC2, FC3 і FC4); (2) введення 250 мкл (300 с) мономерного тау-білка або агрегату фібрилярного тау-білка у відповідну проточну кювету зі швидкістю 50 мкл/хв; (3) повернення до потоку буферу протягом 20 хв. для відстеження фази дисоціації; (4) регенерації поверхонь чіпа шляхом впорскування 25 мкл (30 с) гліцину, pH 1,5; (5) врівноважування поверхонь чіпу шляхом впорскування 50 мкл (60 с) HBS-EP+.

Дані зв'язування з агрегатами тау-білка обробляють із застосуванням стандартного подвійного посилення та підгонки до моделі зв'язування (1:1), із застосуванням програми Biacore 2000 Evaluation, версія 4.1, для визначення швидкості асоціації (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$), швидкості дисоціації (k_{off} , s^{-1}) і R_{max} (одиниці відгуку (RU)). Константу дисоціації у стані рівноваги (K_D) розраховують за співвідношенням $K_D = k_{off}/k_{on}$ в молярних одиницях. Дані зв'язування з мономерним тау-білком не можна точно визначити за допомогою SPR, як описано вище, через велику швидкість асоціації і дисоціації. Тому K_D для зв'язування з мономерним тау-білком визначають за допомогою моделі стаціонарного зв'язування шляхом побудови кривої залежності "концентрація антигену-резонансна одиниця відгуку". Одержані дані щодо зв'язування наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2:

Дані щодо зв'язування мономерного і агрегованого людського тау-білка, одержані за допомогою SPR.

		k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D^* (нМ)
Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1	Мономерний тау-білок	Не виявлено	Не виявлено	235
	Агрегований тау-білок	4,59e4	<1e-5	<0,22
Гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1	Мономерний тау-білок	Не визначено	Не визначено	550
	Агрегований тау-білок	5,75e4	1,02e-4	1,77

*Результати K_D вважаються відносними, оскільки вони не є нормалізованими відносно впливу авідності.

Результати, наведені в Таблиці 2, показують, що моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 не має такого вимірюваного зв'язування з мономерним тау-білком, щоб значення спорідненості можна було точно визначити за допомогою аналізу Biacore (унаслідок високої швидкості асоціації та дисоціації). І навпаки, результати, наведені в Таблиці 2, показують, що моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 має підвищену спорідненість до агрегатів тау-білка, порівняно з гуманізованим генно-інженерним антитілом MC-1.

Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) використовують для визначення відносної зв'язувальної спорідненості ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 до фібрил агрегатів тау-білка з гомогенатів тканини головного мозку пацієнтів з AD. Гомогенати тканини головного мозку пацієнтів з AD одержують з приблизно 80 г кори

головного мозку пацієнтів з AD. Стисло, буфер (TBS/1 mM розчин PMSF (фенілметилсульфонілфторид)/1×повна суміш інгібіторів протеаз (Complete®) (компанія Roche, номер за каталогом 11 697 498 001) та інгібітор фосфатаз (компанія ThermoFischer, номер за каталогом 78428)) додають до тканини головного мозку пацієнтів з AD з розрахунку приблизно 10 мл/1 г (тканини). Тканину гомогенізують за допомогою ручного Kinematica Polytron зі швидкістю 6-7. Далі тканину додатково гомогенізують із застосуванням резервуара високого тиску Parr Bomb (компанія Parr Instrument, номер за каталогом 4653) при 1500 фунтів/дюйм² (10,34 МПа) азоту протягом 30 хв. Гомогенат центрифугують при 28000×g (роторна центрифуга Beckman J14) протягом 30 хв при температурі 4 °C. Супернатант збирають, об'єднують, і пропускають через передколонку висотою 4 см системи Sepharose 400 Superflow для видалення крупнішого дебрису, після чого пропускають через 25 мл колонку MC1-Affigel 10 зі швидкістю потоку 50-60 мл/год. для очищення фібрил тау-білка, що зв'язують MC1. Для доведення ступеню очистки до максимального рівня, супернатант повторно пропускають через колонку MC-1 протягом 18-20 год. при температурі 4 °C. Передколонку видаляють, а колонку MC1 промивають буфером TBS (щонайменше 40 об'ємів колонки). Після цього зв'язані агрегати тау-білка елюють 3M розчином KSCN (2 об'єми колонки), і збирають фракціями, які становлять приблизно 1 мл. Концентрацію білка в кожній елюйованій фракції перевіряють дослідженням на титраційному мікропланшеті за методом Бредфорда. Фракції, що містять позитивні рівні білка, об'єднують, концентрують до приблизно 2 мл, використовуючи Centricon (Millipore Ultracel-30K) при температурі 4 °C, і діалізують із застосуванням касети Slide-A-Lyzer (10K MWCO 3-12 мл, компанія Pierce) протягом ночі на 1 л буферу TBS. Концентрацію тау-білка в фібрилах тау-білка, очищених з гомогенату тканини головного мозку пацієнтів з AD, визначають за допомогою сендвіч-ELISA, використовуючи іммобілізоване антитіло DA-9 та ідентифікувальне антитіло CP27.

Очищені фібрили тау-білка (50 мкл) в PBS вносять в лунки 96-лункових планшетів (компанія Coostar, номер за каталогом 3690) у концентрації, яка відповідає 0,7 мкг/мл загальної кількості тау-білка. Планшети інкубують протягом ночі при температурі 4 °C, після чого тричі промивають 150 мкл PBST (PBS, що містить 0,05 % Твін-20), і блокують в 100 мкл BB3 (компанія ImmunoChemistry Technology, номер за каталогом 643) при кімнатній температурі протягом щонайменше 1 год. (зазвичай 2 год.). Після завершення блокування блокувальний буфер з лунок видаляють. Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 і гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1 (що має каркасну комбінацію: 5-51 важкого ланцюга, A27 легкого ланцюга) розбавляють в 0,25 % розчині казеїнового буферу, і одержують 1000 нМ вихідного розчину, який потім послідовно розбавляють 23 рази з двократним розведенням. 50 мкл вихідного розчину і послідовно розбавлене антитіло (ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 або гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1) додають в окремі лунки, і інкубують протягом 2 год. при кімнатній температурі, після чого планшет промивають чотири рази 200 мкл PBST/лунку. Додають 50 мкл антитіл проти людського IgG з HRP (пероксидаза хрому) (розбавлених 1:4000 в 0,25 % розчині казеїнового буфера), та інкубують протягом 1 год. при кімнатній температурі, після чого планшет промивають чотири рази 200 мкл PBST/лунку. Додають 50 мкл TMB/H₂O₂, та інкубують при кімнатній температурі протягом приблизно 10 хв. Реакцію зупиняють шляхом додавання 50 мкл стоп-розчину (2N H₂SO₄), і вимірюють колориметричний сигнал при 450 нм. Дані вводять у програму Prism 6 (GraphPad), і визначають значення EC₅₀ із застосуванням кривої нелінійної регресії та сигмоїдальної кривої залежності "доза-ефект". Результати наведені в Таблиці 3.

Таблиця 3

Порівняння EC₅₀ зв'язування з очищеними фібрилами тау-білка пацієнтів з AD

Досліджуване антитіло	EC ₅₀ (нМ)
Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1	6,8
Гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1	409,1

Як відображено в Таблиці 3, ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за цим винаходом демонструє у 60 разів більшу спорідненість (визначену за допомогою EC₅₀) до очищених фібрил тау-білка у порівнянні з гуманізованим генно-інженерним антитілом MC-1.

Селективність моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 щодо агрегатів тау-білка у порівнянні з мономером тау-білка визначають за допомогою прямого твердофазного імуноферментного аналізу. Після проведення ELISA, по суті так, як зазначено вище,

рекомбінантний тау-білок (гТау) наносять на 96-лункові планшети у концентрації, яка відповідає або "високій" концентрації (1 мкг/мл), або "низькій" концентрації (15 нг/мл). Висока концентрація гТау при нанесенні на титраційні мікропланшети імітує зв'язування з агрегованим тау-білком. Низька концентрація гТау при нанесенні на титраційні мікропланшети імітує зв'язування з мономером тау-білка. Планшети з нанесеними високими або низькими концентраціями гТау, відповідно, піддають дії ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1, і зв'язування згаданого ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка з відповідними концентраціями гТау визначають по суті так, як описано вище в аналізі ELISA. Результати наведені в Таблиці 4.

Таблиця 4

Порівняння за EC_{50} зв'язування гТау з "високою" концентрацією у порівнянні з гТау з "низькою" концентрацією

Концентрація мономера гТау	EC_{50} (пМ)
"Висока" (1 мкг/мл)	6,0
"Низька" (15 нг/мл)	722,7

Як відображено в Таблиці 4, ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє у 120 разів більшу спорідненість (визначену із застосуванням EC_{50}) до очищених фібрил тау-білка у порівнянні з гуманізованим генно-інженерним антитілом MC-1.

Дослідження цільової взаємодії *ex vivo*

Зв'язування ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 з агрегованим тау-білком, одержаним з головного мозку людей, визначають із застосуванням імуногістохімічного забарвлення фіксованих формаліном й залитих у парафін (FFPE) зрізів головного мозку, одержаних від: "нормальної" людини (яка демонструє мінімальне агрегування тау-білка); пацієнта з AD (який демонструє сильне агрегування тау-білка і формування NFT, а також патологію, пов'язану з амілоїдними бляшками); пацієнта з PD (який демонструє сильне агрегування тау-білка). Забарвленню піддають також зрізи головного мозку, одержані від "контрольної" миші дикого типу, яка не має людського тау-білка, щоб визначити фонові неспецифічні рівні забарвлення.

FFPE зрізи депарафінізують, і регідратують. Далі, на зрізах здійснюють екстракцію антигену (із застосуванням модульної системи Lab Vision PT, компанія Thermo Scientific), яка включає нагрівання зрізів в цитратному буфері (компанія Thermo Scientific, номер за каталогом TA-250-PM1X) протягом 20 хв при температурі 100°C, потім – охолодження зрізів в dH₂O. Після цього зрізи піддають таким семи стадіям інкубації (при кімнатній температурі): (1) 10 хв в 0,03 % розчині H₂O₂; (2) 30 хв в розведенні 1:20 нормальної козячої сироватки (компанія Vector Labs., номер за каталогом S-1000), розбавленої в PBST; (3) 60 хв в ілюстративному моноклональному антитілі проти тау-білка за Прикладом 1 або в гуманізованому генно-інженерному антитілі MC-1 (що має комбінований каркас: 5-51 важкого ланцюга, A27 легкого ланцюга) (як ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка, так і гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1 є нормалізованими до 1 мг/мл, потім розбавленими у PBST до розведення 1:4000 перед інкубацією зі зрізами); (4) 30 хв у кролячому антилюдському IgG₄ (одержаному проти Fc-ділянки ілюстративного антитіла) з концентрацією 1,1 мкг/мл у PBST; (5) 30 хв у біотинільованому козячому антикролячому IgG з розведенням 1:200 (компанія Vector Labs., номер за каталогом BA-1000), розбавленому в PBST; (6) 30 хв в розчині комплексу авідину-біотину (компанія Vector Labs., номер за каталогом PK-7100); (7) 5 хв у 3,3'-діамінобензидині (компанія Vector Labs., номер за каталогом SK-4105). Між кожними з 7 вказаних вище стадій зрізи промивають із застосуванням PBST. Після семи вказаних вище стадій інкубації, зрізи піддають контрастувальному забарвленню гематоксиліном, дегідратують, і покривають накривним склом. Для "контрольних" зрізів мишачої тканини, вищевказану процедуру змінюють на стадії інкубації (3) з використанням розведення 1:8000 (на відміну від розведення 1:4000) як ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка, так і гуманізованого генно-інженерного антитіла; і замінюють стадії інкубації (4) і (5) одним 30 хв інкубуванням біотинільованого козячого антилюдського IgG з розведенням 1:200 (компанія Vector Labs, номер за каталогом BA-3000) у PBST.

За процедурами, здійсненими по суті так, як описано вище, здійснюють дослідження зв'язування ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 з тау-білком, одержаним з головного мозку людини. Результати наведені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Напівкількісний аналіз зв'язування з агрегованим тау-білком в FFPE AD зрізах головного мозку.

	Контроль дикого типу (миші)	Нормальний контроль (людина)	Хвороба Альцгеймера	Хвороба Піка
Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1	-	+	+++	+++
Гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1	-	-	+	+

* Виявлений ступінь важкості агрегованого тау-білка, визначений за схемою напівкількісних показників (важкий, +++; помірний, ++; легкий, +; негативний, -)

Результати, наведені в Таблиці 5, показують, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє значно вищі рівні забарвлення на агрегований тау-білок, як від пацієнтів з AD, так і від пацієнтів з PD, в зрізах гіпокампу, в порівнянні з гуманізованим генно-інженерним антитілом MC-1. Результати, наведені в Таблиці 5, показують також, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 не демонструє більшого неспецифічного зв'язування, ніж гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1 (ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка демонструє зв'язування з мінімальною кількістю агрегированого тау-білка в нормальних контрольних людських зрізах). Далі, оскільки AD і PD характеризуються різними варіантами сплайсингу гена, що кодує тау-білок, ці результати підтверджують висновок про те, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 специфічно зв'язує конформаційний епітоп, що містить амінокислотні залишки 7-9 і 312-322 людського тау-білка (нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має послідовність SEQ ID NO: 13), спільний для агрегатів тау-білка як AD, так і PD.

Нейтралізація розвитку агрегатів тау-білка *in vitro*

Відомо, що гомогенізовані препарати мозкової тканини мишей лінії P301S приблизно 5-місячного віку, у присутності нативного не агрегованого тау-білка індують агрегацію нативного тау-білка, і демонструють вплив агрегації тау-білка, подібний до розвитку. Нерозчинні у саркозилі гомогенізовані препарати мозкової тканини мишей лінії P301S віком від 4,5 міс. до 5 міс. обробляють ультразвуком, і розбавляють OPTI-MEM (GIBCO від компанії Life Tech., номер за каталогом 31985-062) для доведення визначеної кількості тау-білка (на препарат) до кінцевої концентрації 0,77 мкг/мл. Кожен препарат інкубують протягом 30 хв при кімнатній температурі з ілюстративним моноклональним антитілом проти тау-білка за Прикладом 1 (у концентраціях: 21,00 мкг/мл, 7,00 мкг/мл, 2,33 мкг/мл, 0,78 мкг/мл, 0,26 мкг/мл, 0,09 мкг/мл, 0,03 мкг/мл та 0,01 мкг/мл) або з гуманізованим генно-інженерним антитілом MC-1 (у концентраціях: 50,00 мкг/мл, 16,67 мкг/мл, 5,56 мкг/мл, 1,85 мкг/мл, 0,62 мкг/мл, 0,21 мкг/мл, 0,07 мкг/мл, 0,02 мкг/мл і 0,01 мкг/мл).

Клітини НЕК293 (клітинна лінія, одержана з нирок ембріону людини) трансфекують шляхом електропорації для індукції експресії мутантної форми людського тау-білка (1N4L, який має пролін, заміщений на серин, у залишку 301 (P301S) (нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має послідовність SEQ ID NO: 13) (Falcon B., et al., J. Biol. Chem. 290:1049-1065, 2015). Стабільно трансфековані клітини НЕК293 висівають з концентрацією 1×10^4 клітин/лунку у лунки 96-лункового планшету у живильне середовище повного складу (середовище D-MEM (компанія Invitrogen, номер за каталогом 11965-092), 10 % ембріональної бичачої сироватки (компанія Invitrogen, номер за каталогом 16000), 1×пеніциліну/стрептоміцину (компанія Invitrogen, p/n. 15140-122), розчин (5 мкг/мл) бластицину (Blasticin) (компанія Invitrogen, номер за каталогом R210-01), розчин (200 мкг/мл) зеоцину (Zeocin) (компанія Invitrogen, номер за каталогом R250-01)). Планшети інкубують протягом 3 діб при температурі 37°C. Після інкубації додають 1 мг/мл тетрацикліну (розведення 1:1000) на лунку (до кінцевої концентрації 1 мкг тетрацикліну/мл середовища) для індукції експресії мутантного тау-білка. Після цього планшети інкубують протягом 24 год. при температурі 37°C. Після інкубації культуральне середовище видаляють, і додають 50 мкл гомогенізованого

препарату з однією з відповідних концентрацій ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 або гуманізованого генно-інженерного антитіла MC-1 (яка була одержана так, як описано вище). Планшети інкубують протягом трьох годин, після чого гомогенізований препарат видаляють, і до кожної відповідної лунки додають 100 мкл живильного середовища повного складу з 1 мкг/мл тетрацикліну і таку саму відповідну концентрацію ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка або гуманізованого генно-інженерного антитіла MC-1. Планшети інкубують протягом 24 год. при температурі 37 °C, після чого середовище видаляють, і до кожної відповідної лунки додають 100 мкл живильного середовища повного складу і таку саму відповідну кількість ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка або гуманізованого генно-інженерного антитіла MC-1. Планшети інкубують протягом 48 год. при температурі 37°C. Після інкубації клітини промивають 200 мл DPBS, і сушать.

Клітини ресуспендують у 50 мкл буфера Н (TBS pH 7,4, що містить 2 мМ розчин EGTA, 5 мМ розчин EDTA, інгібітор протеаз та фосфатаз (компанія Thermo Scientific, номер за каталогом 784420) на лунку, і обробляють ультразвуком на водяній бані протягом 10 хв. Загальну концентрацію білка визначають із застосуванням аналітичного набору BCA™ Protein Assay (компанія Thermo Scientific, номер за каталогом PI-23227). Рівні агрегатів тау-білка визначають із застосуванням сендвіч-ELISA. 96-лункові планшети сенсibilізують 50 мкл розчину (2 мкг/мл) антитіла AT8 при температурі 4°C протягом ночі. Пластини тричі промивають PBST, потім блокують 100 мкл BB3 протягом 1 год. при кімнатній температурі. Стандартну криву одержують, із застосуванням сукупного екстракту тканини головного мозку пацієнта з AD, одержаного послідовним розведенням в 0,25 % казеїновому буфері із застосуванням двократного розведення з початкової концентрації 40 мкг/мл до кінцевої концентрації 0,3125 мкг/мл. Клітинні лізати розбавляють 0,25 % казеїновим буфером до загальної концентрації білка приблизно 0,1 мг/мл. Потім 50 мкл кожного стандартного розведеного зразка або розведених клітинних зразків додають у окремі лунки заблокованих планшетів, і інкубують при температурі 4 °C протягом ночі, після чого планшети чотири рази промивають PBST. Біотинільоване антитіло CP27 розбавляють 1:2000 0,25 % казеїновим буфером, і потім 50 мкл додають у лунки, що містять зразки. Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 2 год., після чого планшети чотири рази промивають PBST. Стрептавідин-HRP (компанія Invitrogen, номер за каталогом SNN2004) розбавляють 1:5000 0,25 % казеїновим буфером, потім до кожної лунки додають 50 мкл, і планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 1 год. Після інкубації планшети 4 рази промивають PBST, і додають 50 мкл суміші (1:1) H₂O₂ і TMB (компанія Thermo Scientific, номер за каталогом 34021). Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 10 хв, і реакцію зупиняють шляхом додавання 50 мкл H₂SO₄. Колориметричний сигнал вимірюють при 450 нм або 650 нм. Рівні AT8-позитивного тау-білка нормалізують відносно загальних рівнів білка у кожному зразку. Нормалізовані значення для кожного зразка додатково нормалізують відносно рівнів AT8-позитивного тау-білка у контрольних зразках (не оброблених антитілом). Відсоток інгібування розвитку агрегатів тау-білка в кожному зразку визначають шляхом віднімання додатково нормалізованих значень від 100, і відсоткове значення інгібування для кожного зразка вводять у програму Prism 6 (GraphPad), застосовуючи підгонку кривої нелінійної регресії та сигмоїдну криву залежності "доза-ефект" для визначення значень EC₅₀. Результати наведені в Таблиці 6.

Таблиця 6

Значення EC₅₀, які відображають інгібування розвитку агрегатів тау-білка.

	Ілюстративне генно-інженерне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1	Гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1
EC ₅₀ (відображає розвиток агрегатів AT8-позитивного тау-білка (нг/мл))	16	476

Результати, наведені в Таблиці 6, відображають те, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє приблизно 30-кратне посилення інгібування індукованого розвитку агрегатів тау-білка.

Нейтралізація розвитку агрегатів тау-білка *in vivo*

Відомо, що гомогенізовані препарати тканини стовбуру головного мозку мишей лінії P301S приблизно 5-місячного віку, у разі ін'єкції в гіпокамп нормальних мишей-самиць лінії P301S 10-

тижневого віку, індукують агрегацію нативного неагрегованого тау-білка, і демонструють вплив, подібний до розвитку агрегації тау-білка. Гомогенізовані препарати тканини стовбуру головного мозку мишей лінії P301S 4,5-5-місячного віку готують по суті так само, як описано вище.

Нормальним мишам-самицям лінії P301S 10-тижневого віку в ліву півкулю гіпокампу ін'єкцією вводять 5 мкл гомогенізованого препарату тканини головного мозку і 7,5 мкг ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 (N=12), або 7,5 мкг контрольного антитіла людини IgG₄ (N=11). Через чотири тижні після ін'єкції мишей вмертвляють, ліву і праву півкулі збирають, заливають парафіном, і 6 мкм послідовні зрізи укладають на предметні стекла. Предметні стекла з брегмою (A-P=-2,30) депарафінізують, тканину регідратують, і здійснюють екстракцію антигена шляхом нагрівання предметного скла до температури 100°C протягом 20 хв в цитратному буфері. Предметні стекла охолоджують в dH₂O, і інкубують при кімнатній температурі відповідно наведеним нижче етапам: (а) 10 хв в 0,03 % розчині H₂O₂; (b) 30 хв в розведенні 1:20 нормальної козячої сироватки; (с) 60 хв в розведенні 1:8000 антитіла PG-5 (розбавленого PBST) (антитіло PG-5 одержали з лабораторії Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University; антитіло PG-5 специфічно зв'язує серин на залишку 409 тау-білка при фосфорилуванні, нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має послідовність SEQ ID NO: 13); (d) 30 хв у розведенні 1:200 біотинільованого козячого антимишачого антитіла IgG (розбавленого PBST); (е) 30 хв в розчині комплексу авідину-біотину; і (f) 5 хв і 3,3'-діамінобензидині. PBST використовують для промивання між відповідними етапами. Після 5 хв інкубації в 3,3'-діамінобензидині, зрізи піддають контрастувальному забарвленню гематоксиліном, потім дегідратують, і покривають накривним склом. Забарвлювальний сигнал вимірюють за допомогою сканера Scanscope AT Slide Scanner (компанія Aperio) при 20-кратному збільшенні. Здійснюють кількісне визначення імунореактивності PG-5 у відсотковому вираженні, із застосуванням позитивного піксельного алгоритму програми Imagescope Software (v. 11.1.2.780, компанія Aperio). Результати наведені в Таблиці 7.

Таблиця 7

Середнє значення % імунореактивності PG-5 у лівому та правому гіпокампі, відповідно.

	(% імунореактивності PG-5)	
	Лівий гіпокамп	Правий гіпокамп
Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1	2,52±0,49 SEM (середня квадратична помилка середнього)	0,63±0,13 SEM
Контрольне антитіло IgG ₄	6,38±0,93 SEM	1,88±0,31 SEM

Результати, наведені в Таблиці 7, демонструють, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 зменшує рівень агрегації тау-білка як у лівому, так і у правому гіпокампі, порівняно з контрольним антитілом IgG₄. Як показано, ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка спричинює на 60,5 % більше зниження агрегації тау-білка в лівому гіпокампі, і на 66,5 % більше зниження агрегації тау-білка в правому гіпокампі, відповідно, в порівнянні з контрольним антитілом IgG₄. Ці результати доводять, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка має активність щодо нейтралізації розвитку агрегації тау-білка.

Дослідження ефективності in vivo на мишачій моделі Tg4510

Трансгенні миші лінії Tg4510 експресують мутантну форму людського тау-білка (4R0N, пролін якого на залишку 301 замінено на лейцин (P301L), Ramsden M., et al., J. Neuroscience., 25: 10637-10647 (2005) та Santacruz K., et al., Science (2005); нумерація залишків має за основу ілюстративний людський тау-білок, що має послідовність SEQ ID NO: 13). Миші лінії Tg4510 демонструють високий рівень експресії мутантного людського тау-білка P301L на ділянках гіпокампу та неокортексу, що свідчить про залежне від віку прогресування агрегації тау-білка.

Антитіла проти тау-білка за цим винаходом можуть індукувати імуногенну реакцію у мишей лінії Tg4510. Тому для того, щоб перевірити на моделі гризунів терапевтичний потенціал моноклональних антитіл проти тау-білка за цим винаходом при постійному введенні, сконструювали сурогатне антитіло проти мишачого тау-білка, для якого мішенню є той самий конформаційний епітоп, і яке демонструє аналогічні рівні поліпшеної спорідненості відносно ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1. Згадане сурогатне антитіло проти тау-білка має спорідненість (EC₅₀) до очищених фібрил тау-білка AD, визначену

із застосуванням ELISA так, як описано вище (для ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1), що дорівнює 13,1 пМ.

Мишей-самиць лінії Tg4510 восьмитижневого віку згруповують у 3 окремі групи. Першій групі (N=15) вводять контрольне мишаче антитіло IgG1 (15 мг/кг) двічі на тиждень протягом 9 тижнів. Другій групі (N=15) двічі на тиждень протягом 9 тижнів вводять рекомбінантне антитіло MC-1 (15 мг/кг), яке було одержане з асцити мишей, яким було впорскнуто гібридомне MC-1. Третій групі (N=15) вводять сурогатне мишаче антитіло проти тау-білка (15 мг/кг) двічі на тиждень протягом 9 тижнів. Після останнього введення мишей вмертвляють, і збирають їх мозок. Збирають зрізи кори і гіпокампу, заливають парафіном, і 6 мкм послідовні зрізи вкладають на предметні стекла для проведення імуногістохімічних досліджень.

Залишки коркової ділянки зібраних мізків гомогенізують шляхом імпульсної обробки ультразвуком у об'ємі буферу Н, який у 10 разів перевищує об'єм кори, і центрифугують при 21000 g протягом 20 хв при температурі 4 °С. Збирають аліквоту супернатанту з кожної кори, і загальні рівні білка визначають із застосуванням аналітичного набору BCA™ Protein Assay (компанія Thermo Scientific, номер за каталогом PI-23227) відповідно до протоколу виробника. Решту супернатанту центрифугують при 100000 g протягом 1 год. при температурі 4 °С, супернатант викидають, а одержаний нерозчинний осад ресуспендують в буфері Н (в об'ємі 1/2 від об'єму викинутого супернатанту). Ресуспендований осад обробляють ультразвуком, і рівні агрегату AT8-позитивного тау-білка в кожному осаді визначають за допомогою ELISA, із застосуванням іммобілізованого антитіла AT8 та ідентифікувального антитіла CP27, по суті так, як описано вище. Рівні агрегату AT8-позитивного тау-білка нормалізують відносно загальних рівнів білка.

Аналогічно, залишок гіпокампу зібраних мізків гомогенізують шляхом імпульсної обробки ультразвуком у об'ємі буферу Н, який у 10 разів перевищує об'єм гіпокампу, і центрифугують при 21000 g протягом 20 хв при температурі 4 °С. Збирають супернатант з кожного гіпокампу, і визначають загальні рівні білка. Рівні агрегату AT8-позитивного тау-білка в супернатанті визначають за допомогою ELISA, із застосуванням іммобілізованого антитіла AT8 та ідентифікувального антитіла CP27 по суті так, як описано вище. Рівні агрегату AT8-позитивного тау-білка нормалізують відносно загальних рівнів білка. Результати наведені в Таблиці 8.

Таблиця 8

Рівні агрегату AT8-позитивного тау-білка в гомогенаті кори і гіпокампу головного мозку, визначені за допомогою ELISA.

	Рівень агрегату AT8-позитивного тау-білка (мкг/мг)	
	Кора	Гіпокамп
Сурогатне мишаче антитіло проти тау-білка	1416±195 SEM	386±71 SEM
Контрольне антитіло mIgG1	1872±198 SEM	591±66 SEM
rMC-1 mIgG1 Ab	1703±138 SEM	510±62 SEM

Результати, наведені в Таблиці 8, показують, що сурогатне мишаче антитіло проти тау-білка зменшило рівні агрегату тау-білка як у корі, так і в гіпокампі, на 24 % і 35 %, відповідно, у порівнянні з мишами, обробленими контрольним mIgG1. Крім того, результати показують, що миші, оброблені рекомбінантним мишачим антитілом MC-1, не демонструють підвищеного зниження рівнів тау-агрегату у порівнянні з мишами, обробленими контрольним mIgG1.

Рівень агрегації тау-білка в залитих парафіном зрізах кори та гіпокампу, одержаних із зібраного мозку, також визначається імуногістохімічними методами з використанням PG-5 по суті так, як описано вище. Дані нормалізують шляхом перетворення на log₁₀ значення, і результати в узагальненому вигляді наведені в Таблиці 9.

Таблиця 9

Середнє \log_{10} значення % імунореактивності PG-5 у корі та гіпокампі.

	Агрегат тау-білка (середнє \log_{10} значення % імунореактивності PG-5)	
	Кора	Гіпокамп
Сурогатне мишаче антитіло проти тау-білка	0,74±0,06	0,26±0,07
Контрольне антитіло mIgG1	0,90±0,05	0,46±0,05
rMC-1 mIgG1 Ab	0,83±0,04	0,34±0,06

Результати, наведені в Таблиці 9, демонструють, що сурогатне мишаче антитіло проти тау-білка знижує рівень агрегату тау-білка як у корі (на 18 %), так і в гіпокампі (на 43 %), порівняно з контрольним антитілом mIgG1, тоді як рекомбінантне мишаче антитіло MC-1 не демонструє помітного зниження рівня агрегату тау-білка ні в корі, ні в гіпокампі відносно контрольного антитіла mIgG1.

Фізико-хімічні властивості генно-інженерного моноклонального антитіла проти тау-білка

Ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє хорошу розчинність, хімічну стабільність та фізичну стабільність.

Розчинність:

Достатньо висока розчинність є бажаною для забезпечення зручного дозування. Наприклад, доза 1 мг/кг, введена 1,0 мл ін'єкцією пацієнту масою 100 кг, потребує розчинності 100 мг/мл. Крім того, бажано також підтримати антитіло в мономерному стані без агрегації високомолекулярних (HMW) білків при високій концентрації. Розчинність ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 досліджували шляхом концентрації 15 мг згаданого ілюстративного антитіла за допомогою фільтра з межею пропускання по молекулярній масі 10 K (фільтри Amicon U.C., Millipore, № за каталогом UFC903024) до об'єму менше ніж 100 мкл. Остаточну концентрацію зразка вимірювали із застосуванням УФ-абсорбції за методикою A280 із застосуванням Nanodrop 2000 (компанія Thermo Scientific).

Після процедур, виконаних по суті так, як описано вище, ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє розчинність більшу за: 140 мг/мл (при pH 6 у 10 mM цитратному буфері); 177 мг/мл (при pH 6 у 10 mM цитратному буфері з 150 mM NaCl); і 170 мг/мл (при pH 7,4 у буфері PBS). Крім того, при високій концентрації наявні лише низькі рівні HMW (від ~ 3 % до ~ 5,4 %), і не спостерігається розділення фаз.

Хімічна і фізична стабільність:

Хімічна стабільність полегшує розробку композицій для лікарських засобів з достатнім терміном зберігання. Хімічну стабільність ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 оцінювали шляхом виготовлення композиції з ілюстративним моноклональним антитілом проти тау-білка з концентрацією 1 мг/мл в 10 mM цитратному буфері з pH 4, 5, 6 або 7. Зразки виготовленої композиції інкубували протягом чотирьох тижнів при температурі 4 °C, 25 °C, або 40 °C в прискореному дослідженні деградації. Зміни профілю заряду антитіла, що відображають хімічні зміни, оцінюють за допомогою капілярного ізоелектричного фокусування (cIEF) відповідно до стандартних процедур.

Після процедур, виконаних по суті так, як описано вище, ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 демонструє результати з хімічної стабільності, наведені в Таблиці 10.

Таблиця 10

Підсумкові дані щодо зміни % головного піку протягом чотирьох тижнів відносно зразків, інкубованих при температурі 4 °C, що визначалась за допомогою cIEF, та % HMW агрегатів, що визначалась за допомогою SEC.

pH	Зміна % головного піку протягом чотирьох тижнів при 25 °C (відносно зразків, інкубованих при температурі 4 °C)	Зміна % HMW агрегатів при 25°C (відносно зразків, інкубованих при температурі 4 °C)	Зміна % HMW агрегатів при 40°C (відносно зразків, інкубованих при температурі 4 °C)
4	-8,43	-0,1	49,8
5	-4,13	0,1	1,1
6	-3,95	-0,2	0,3
7	-3,69	-0,2	0,9

Результати, наведені в Таблиці 10, показують, що після 4 тижнів зберігання при температурі 40 °C ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 має відсоток зниження головного піку лише 1,1 відсоткових точок, коли при виготовленні pH становило 5, і зниження лише 0,3 відсоткових точок, коли при виготовленні pH становило 6 (звичайний показник pH, що використовується при виготовленні композиції з антитілом). Крім того, мас-спектрометричний аналіз демонструє лише мінімальну деградацію, яка спостерігається після 4 тижнів зберігання при температурі 40 °C (~ 1,5 % деамідування LCDR1 з деградацією менш ніж 5 % у всіх послідовностях CDR), що свідчить про те, що ілюстративне моноклональне антитіло проти тау-білка за Прикладом 1 має достатню хімічну стабільність для полегшення розробки рідких лікарських форм з адекватним терміном зберігання.

Для порівняння, хімічну і фізичну стабільність гуманізованого генно-інженерного антитіла MC-1 (що має комбінований каркас: 5-51 важкого ланцюга, A27 легкого ланцюга) оцінювали шляхом інкубації вказаного антитіла протягом 2 тижнів при температурі 40 °C при pH 8. Згадане гуманізоване генно-інженерне антитіло MC-1 показало значну хімічну деградацію, в тому числі 12 % деамідування LCDR1, 5 % деамідування та 10 % ізомеризацію в HCDR3 і 3 % окиснення каркасу HC.

Зв'язувальну спорідненість, після чотиритижневого прискореного дослідження ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 щодо деградації, оцінювали шляхом виготовлення композиції ілюстративного моноклонального антитіла з концентрацією 1 мг/мл в 10 мМ цитратному буфері з pH 4 або pH 6. Зразки вказаної композиції інкубували протягом чотирьох тижнів при температурі 4 °C або 40 °C в прискореному дослідженні щодо деградації. Після інкубації, зв'язувальну спорідненість ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 до гТау (15 нг/мл), нанесеного на 96-лункові планшети, визначали за допомогою прямого твердофазного імуноферментного аналізу за процедурою ELISA, по суті так, як описано вище. Результати описаного вище дослідження зв'язувальної спорідненості, виконаного з повторенням, наведені в Таблиці 11.

Таблиця 11

Порівняння EC₅₀ після прискореного дослідження на деградацію.

pH Композиції	Температура інкубації (°C)	EC ₅₀ (пМ) Дослідження 1	EC ₅₀ (пМ) Дослідження 2
4	40	414	277
6	4	926	636
6	40	754	667

Таблиця 11 демонструє, що зв'язувальна спорідненість ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка за Прикладом 1 до низьких концентрацій гТау залишилась однаковою для зразків після чотиритижневої прискореної деградації, порівняно з контрольними зразками, інкубованими при температурі 4 °C.

Послідовності

SEQ ID NO: 1 – LC ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRFSGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
5 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2 – HC ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKYEKNF
10 KGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNVDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS
RSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
15 SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 3 – LCDR1 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

RSSQSLVHSNQNTYLH

SEQ ID NO: 4 – LCDR2 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
20 за Прикладом 1

YKVDNRF

SEQ ID NO: 5 – LCDR3 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

SQSTLVPLT

SEQ ID NO: 6 – HCDR1 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
25 за Прикладом 1

KGSGYTFSNYWIE

SEQ ID NO: 7 – HCDR2 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

30 EILPGSDSIKYEKNFKG

SEQ ID NO: 8 – HCDR3 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

ARRGNVDD

SEQ ID NO: 9 – LCVR ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
35 за Прикладом 1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRFSGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKEIK

SEQ ID NO: 10 – HCVR ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка
за Прикладом 1

40 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKYEKNF
KGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNVDDWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 11 – Нуклеотидна послідовність, що кодує ілюстративний LC (SEQ ID NO:1)

gaaattgtgtgacgcagctccaggcaccctgtcttgtctccagggaaagagccaccctctcctgcagatctagtcagagcctgtaca
cagtaatcagaacacatttaccattggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatataaagttgacaaccgattttctggcat
45 cccagacaggttcagtgccagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgagtgattactgttctca
aagtacactggtccgctcacgttcggcgaggaggaagtgagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgtgaataactctatcccagagaggcgaagtagtggaaggtggataacg
ccctcaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgctgagc
aaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggcctgagctcgccgctcacaagagcttcaacagggg
50 agagtgc

SEQ ID NO: 12 – Нуклеотидна послідовність, що кодує ілюстративний HC (SEQ ID NO: 2)

gagggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagctctgaagatctcctgaagggttctggctacacattcagt
aactactgtagagagtggtgagccagatgcccgggaagggcctggagtgatgggggagattttacctggaagtgatagattaagtacga
aaagaatttcaagggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgctacctgcagtgagcagcctgaaggcctcgacac
55 cgccatgtattactgtgcgagaaggggaactacgtggacgactggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcagcttctaccaagggcc
catcggtcttcccgctagcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagccgcctgggctgctgtgtaaggactactccccgaaccg
gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagc
gtggtgaccgtgcccctccagcagctgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaaagccagcaacaccaaggtggacaagag
agttgagtcacaaatagttccccatgcccaccctgcccagcacctgaggccgcccgggggaccatcagcttctctgttcccccaaaacccaa
60 ggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgt

ggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggcagcgtcctcaccgtcctg
caccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt
5 actccgacggctccttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggt

SEQ ID NO: 13 – Амінокислотна послідовність людського непроцесованого тау-білка

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEGSEEPGSE
TSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAPHTPEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS
10 KSKDGTGSDDKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRS
GYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGS
TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHH
KPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV
VSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPLATLADEVASLAKQGL

15

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ ТАУ-БІЛКА І ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> X20624

<150> US 62/121,116

<151> 2015-02-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2

<211> 442

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> НС ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-
білка Прикладу 1

<400> 2

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

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

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

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

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

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

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

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

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

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> LCDR1 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 3

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LCDR2 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 4

Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LCDR3 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 5

Ser Gln Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR1 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 11

<400> 6

Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR2 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 11

<400> 7

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

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCDR3 ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 8

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp
1 5

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LCVR ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HCVR ілюстративного моноклонального антитіла проти тау-білка Прикладу 1

<400> 10

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1              5              10              15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
                20              25              30
Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
          35              40              45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe
          50              55              60
Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85              90              95
Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100              105              110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 11

<211> 657

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує ілюстративний LC (SEQ ID NO:1)

<400> 11

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gatctagtc gagccttgta cacagtaatc agaacaccta ttacattgg      120
taccagcaga aacctggcca ggtcccgagg ctctcatct ataaagttga caaccgattt      180
tctggcatcc cagacagggt cagtggcagt ggggtctggga cagacttcac tctcaccatc      240
agcagactgg agcctgaaga tttgcagtg tattactgtt ctcaaagtac actggttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgga ccgtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540

```

```

agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      600
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgc      657

<210> 12
<211> 1326
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує ілюстративний НС (SEQ
ID NO: 2)

<400> 12
gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggcta cacattcagt aactactgga tagagtgggt gcgccagatg      120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggag attttacctg gaagtgatag tattaagtac      180
gaaaagaatt tcaagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagaaggggg      300
aactactgtg acgactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttctaccaag      360
ggcccatcgg tcttcccgct agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc      420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc      480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac      600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagtcaa atatggtccc      660
ccatgccac cctgccagc acctgaggcc gccgggggac catcagtctt cctgttcccc      720
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg      780
gacgtgagcc aggaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg      840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      900
gtcctcaccg tcttcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      960
aacaagggc tcccgctct catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      1020
gagccacagg tgtacacct gcccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      1080
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaat      1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc      1200
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca      1260
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct      1320
ctgggt      1326

<210> 13
<211> 441
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

<220>

<223> Амінокислотна послідовність людського неprocесованого tau-білка

<400> 13

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Моноклональне антитіло, яке зв'язує людський тау-білок і яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR представлена послідовністю SEQ ID NO: 9, і амінокислотна послідовність HCVR представлена послідовністю SEQ ID NO: 10.
2. Моноклональне антитіло за п. 1, яке містить легкий ланцюг (LC) і важкий ланцюг (HC), яке
- 10 **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність LC представлена послідовністю SEQ ID NO: 1, і амінокислотна послідовність HC представлена послідовністю SEQ ID NO: 2.
3. Молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1.
4. Молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має
- 15 амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
5. Молекула ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
6. Клітина ссавця, яка містить молекулу ДНК за п. 3 та молекулу ДНК за п. 4, яка **відрізняється**
- 20 тим, що згадана клітина здатна експресувати моноклональне антитіло, що містить легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
7. Клітина ссавця, яка містить молекулу ДНК за п. 5, яка **відрізняється** тим, що згадана клітина здатна експресувати моноклональне антитіло, що містить легкий ланцюг, який має
- 25 амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
8. Спосіб одержання моноклонального антитіла, що містить легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і цей спосіб включає культивування клітини ссавця за будь-яким з
- 30 пп. 6 та 7 за таких умов, що моноклональне антитіло експресується, і виділення експресованого моноклонального антитіла.

9. Моноклональне антитіло, одержане за способом за п. 8.
10. Фармацевтична композиція, яка містить моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1 та 2 і один або декілька фармацевтично прийнятний(их) носій(ів), розріджувач(ів) або наповнювач(ів).
11. Спосіб лікування хвороби Альцгеймера, прогресуючого супрануклеарного параліча або
5 хвороби Піка, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості моноклонального антитіла за будь-яким з пп. 1 та 2.
12. Спосіб лікування хвороби Альцгеймера, прогресуючого супрануклеарного параліча або хвороби Піка, що включає введення пацієнту, який потребує цього, фармацевтичної композиції за п. 10.
- 10 13. Моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1 та 2 для застосування в терапії.
14. Моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1 та 2 для застосування в лікуванні захворювання, вибраного з групи, яку складають хвороба Альцгеймера, прогресуючий супрануклеарний параліч і хвороба Піка.
- 15 15. Моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1 та 2 для застосування у виробництві лікарського засобу для лікування хвороби Альцгеймера, прогресуючого супрануклеарного паралічу або хвороби Піка.