

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201691708** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2017.03.31

(22) Дата подачи заявки
2015.03.12

(51) Int. Cl. *A01K 67/027* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ ПРОТИВОДЕЙСТВОВАТЬ ПОВРЕЖДЕНИЮ
β-КЛЕТОК, ИНДУЦИРУЕМОМУ ОСТРОВКОВЫМ АМИЛОИДНЫМ
ПОЛИПЕПТИДОМ, И НАРУШЕНИЮ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ**

(31) 14159194.1

(32) 2014.03.12

(33) EP

(86) PCT/EP2015/055238

(87) WO 2015/136055 2015.09.17

(71) Заявитель:

**НЕЙРИММЬОН ХОЛДИНГ АГ;
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЦЮРИХ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Гримм Ян (CH), Хейтц Фабрис (FR),
Вирт Фабиан, Вельт Тобиас (CH)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Описаны молекулы, специфически связывающие островковый амилоидный полипептид человека (hIAPP), также известный как амилин, в частности антитела человеческого происхождения, также как их фрагменты, производные и варианты, для противодействия повреждению β-клеток, вызванному островковым амилоидным полипептидом (IAPP), и нарушению толерантности к глюкозе, которые являются симптомами, как правило, связанными с сахарным диабетом 2 типа (T2D).

201691708
A1

201691708

A1

Новые соединения, способные противодействовать повреждению β -клеток, индуцируемому островковым амилоидным полипептидом, и нарушению толерантности к глюкозе

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в основном относится к молекулам, специфично связывающим островковый амилоидный полипептид человека (hIAPP), также известный как амилин, в особенности к антителам человека, а также к фрагментам, производным и вариантам указанных антител для борьбы с повреждением β -клеток, индуцируемым островковым амилоидным полипептидом (IAPP), и нарушением толерантности к глюкозе, которые являются симптомами, как правило, связанными с сахарным диабетом 2 типа (T2D).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Накопление, модификации и агрегация белка являются патологическими аспектами многочисленных метаболических заболеваний, включающих хорошо известные нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Хантингтона, Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП) (Taylor *et al.*, Science 296 (2005), 1991-1995). Патологическая агрегация белка также связана с метаболическими заболеваниями, такими как сахарный диабет 2 типа (T2D) и отторжением островков после клинической трансплантации панкреатического островка лицам с сахарным диабетом 1 типа (T1D). Нарушенная укладка и агрегация белков ведут к развитию амилоидных отложений и, по-видимому, непосредственно связаны с клеточной токсичностью при таких заболеваниях. Островковый амилоидный полипептид (IAPP или амилин) представляет собой физиологический пептид, секретируемый совместно с инсулином β -клетками поджелудочной железы, который формирует фибриллярные агрегаты в панкреатических островках (также называемых островками Лангерганса) у пациентов с T2D и, как полагают, играет роль в развитии данного заболевания (Westermarck *et al.* (2011), *Physiol. Rev.* 91(3): 795-826). Более того, как упоминалось ранее, агрегаты IAPP были найдены в панкреатических островках после трансплантации изолированных островков у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (T1D).

IAPP человека (hIAP) представляет собой пептидный гормон, который состоит из 37 аминокислот и имеет дисульфидную связь между остатками цистеина 2 и 7 и

амидированный С-конец. Панкреатические островки на 65 до 80% состоят из β -клеток, которые продуцируют и секретируют инсулин и IAPP, необходимые для регуляции уровней глюкозы в крови и клеточного метаболизма. IAPP процессируется из препрогормона препро-IAPP, предшественника, состоящего из 89 аминокислот, продуцируемого β -клетками поджелудочной железы.

Препо-IAPP после трансляции быстро расщепляется с образованием проостровкового амилоидного полипептида, полипептида из 67 аминокислот, который подвергается дополнительному протеолизу и пост-трансляционным модификациям для образования hIAPP. Экспрессия hIAPP регулируется совместно с инсулином, так как повышенное образование инсулина ведет к повышенным уровням hIAPP. hIAPP высвобождается из β -клеток поджелудочной железы в кровотоки и участвует в гликемической регуляции посредством опорожнения желудка и контроля насыщения, действуя синергическим образом совместно с инсулином.

15

При диабете 2 типа (T2D) генетические детерминанты и факторы окружающей среды приводят к развитию резистентности к инсулину, за которой следует компенсаторное увеличение массы β -клеток и секреции инсулина и амилина (hIAPP), чтобы поддерживать нормальные уровни глюкозы в крови. Полученные высокие концентрации амилина способствуют формированию токсических олигомеров островкового амилоидного полипептида человека (hIAPP) и отложению фибрилл hIAPP, которые обнаружены более чем у 90% больных T2D. Образование отложений hIAPP коррелирует с уменьшением инсулин-вырабатывающих β -клеток, и, также предполагается, играет роль в потере β -клеток в панкреатических островках, трансплантированных лицам с сахарным диабетом 1 типа.

25

Диабет 2 типа (T2D) является наиболее распространенной формой диабета, на которую приходится приблизительно 90% всех случаев. От данного заболевания страдают более 200 миллионов людей во всем мире, что приводит к более чем миллиону летальных исходов от диабета ежегодно. Более 300.000 пациентов поражено в Швейцарии. Распространение сахарного диабета резко увеличивается как в развитых, так и в развивающихся странах из-за роста численности населения, старения, урбанизации и значительного распространения ожирения и отсутствия физической активности. По прогнозам мировой рынок препаратов от диабета 2 типа, составляющий 25 млрд

30

долларов США, к 2016 году достигнет 35 млрд долларов США с совокупными ежегодными темпами роста 6.4% за 2009 - 2016 гг. Современные способы лечения включают регулирование общественного питания и фармакологическое вмешательство, воздействующее на различные пути снижения уровня глюкозы в крови или путем
5 усиления чувствительности к инсулину или путем стимулирования поджелудочной железы к высвобождению инсулина. Ни один из доступных способов лечения не может, однако, противодействовать агрегации hIAPP и потере β -клеток поджелудочной железы. Новые стратегии для лечения диабета 2 типа включают аналоги глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) и ингибиторов дипептидилпептидазы 4 (DPP 4), фермента, который
10 инактивирует эндогенный GLP-1. Эти стратегии основаны на мощном инсулиотропном действии GLP-1 и его способности усиливать пролиферацию бета-клеток.

Более новые и перспективные стратегии включают в себя разработку противовоспалительных препаратов или антител, мишенью которых является путь $\text{IL-1}\beta$. (Donath *et al.* (2008), *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4(5): 240-241; Ehes *et al.* (2009),
15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(33): 13998-14003 ; Owyang *et al.* (2010), *Endocrinology* 151(6): 2515-2527; Dinarello *et al.* (2010), *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17(4): 314-321; Boni-Schnetzler *et al.* (2011), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(10): 4065-4074; Boni-Schnetzler *et al.* (2012), *Br. J. Clin. Pharmacol.*; Cavelti-Weder *et al.* (2012), *Diabetes Care*).
20 Важно подчеркнуть, что недавние исследования показывают, что hIAPP специфично индуцирует инфламмосому – систему $\text{IL-1}\beta$, ведущую к активации системы врожденного иммунитета (Masters *et al.* (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 897-904; Mandrup-Poulsen *et al.* (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 881-883), таким образом поддерживая терапевтическую стратегию, нацеленную на агрегацию hIAPP.

25 До сих пор активные и пассивные иммунотерапевтические подходы в отношении hIAPP и/или про-hIAPP, такие как описаны в международной заявке WO03/092619, основываются и требуют выведения фибрилл hIAPP и островкового амилоида. Однако до сих пор нет экспериментального подтверждения, что иммунотерапия может быть
30 успешно использована. Наоборот, исследования *in vivo* показали, что, хотя вакцинация была способна индуцировать антитела против токсического олигомерного IAPP, она не предотвращала апоптоз, индуцируемый hIAPP, в β -клетках трансгенных по hIAPP мышей; см. Lin *et al.*, *Diabetes* 56 (2007), 1324–1332.

Суммируя вышесказанное, существует безотлагательная потребность в новых терапевтических агентах и стратегиях для устранения нарушений, индуцируемых hIAPP, таких как повреждение β -клеток, нарушение толерантности к глюкозе, аномальное увеличение веса и тому подобное.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к молекулам, связывающимся с островковым амилоидным полипептидом человека (hIAPP), для применения для защиты β -клеток от повреждения, индуцируемого hIAPP, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или для восстановления нарушенной толерантности к глюкозе, вызванной hIAPP, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом предпочтительно указанная молекула, связывающая hIAPP, селективно связывает агрегированный hIAPP в ткани поджелудочной железы субъекта, представляющего собой человека, имеющего диабет.

15 Настоящее изобретение среди прочего основано на неожиданном наблюдении, что уровень связывания молекулы, связывающей hIAPP, такой как антитело к hIAPP, к агрегатам IAPP, формируемым *in vitro*, и к агрегатам IAPP *in vivo* в ткани поджелудочной железы, полученной от пациентов, имеющих диабет, непредсказуем в отношении активности *in vivo* и, таким образом, в терапевтическом применении. Таким образом, 20 предварительный отбор кандидатов из числа соединений, основанный на анализах *in vitro*, может отсортировать биологически активные агенты в первую очередь посредством их ненадлежащих качеств *in vitro*. Следовательно, так как тестирование на животных является трудоемким и отнимающим много времени, биохимические и клеточные тесты *in vitro* более предпочтительны при отборе кандидата в качестве 25 лекарственного средства. Это преимущественно касается трансгенных по IAPP животных моделей для лечения диабета, так как, например, модели на мышах, доступные до сих пор, или спонтанно не развивают диабет, или только спонтанно развивают диабет с гипергликемией и нарушением толерантности к глюкозе в возрасте от 6 до 10 месяцев. Кроме того, зачастую наблюдают только лишь минимальное отложение амилоида у 30 мышей, спонтанно развивающих диабет, или только в возрасте от 12 до 24 месяцев.

Согласно настоящему изобретению, предложена новая трансгенная по IAPP модель на животных, см. Примеры, подходящая в качестве надежной системы скрининга кандидатов из числа соединений, позволяющая делать тесты в разумные строки и, таким

образом, подходящая для применения в масштабах промышленности и фармацевтики, соответственно. В частности, в модели на животных согласно настоящему изобретению спонтанно развивается диабет, характеризующийся нарушением толерантности к глюкозе и гипергликемией уже в возрасте 1 и 2 месяцев (Фиг. 4), соответственно, и
5 внеклеточные амилоидные отложения появляются с 2-месячного возраста, и обширный амилоидоз, связанный с потерей β -клеток, наблюдают с 4-месячного возраста. Таким образом, вследствие относительно короткого промежутка времени развития патофизиологии у трансгенных животных согласно настоящему изобретению, включающей клинические релевантные медицинские показания, наблюдаемые у
10 пациентов, страдающих диабетом, новая модель на животных особенно подходит для скрининга и проверки антидиабетических агентов. Безусловно, хотя модель на животных согласно настоящему изобретению особенно подходит для анализа молекул, связывающих hIAPP, также могут быть протестированы другие соединения-кандидаты, как например, агенты, которые действуют на выше- или нижележащие компоненты пути
15 IAPP/инсулин и/или способны антагонизировать или улучшать медицинские показания, индуцированные гетерологичной экспрессией IAPP у животного.

Как показано в Примерах, в соответствии с настоящим изобретением эффективность молекулы, связывающей hIAPP, селективно связывающей агрегированный hIAPP в
20 ткани поджелудочной железы субъекта, представляющего собой человека, имеющего диабет (Фиг. 2 и 3), может быть подтверждена при защите β -клеток от повреждения, индуцируемого hIAPP, и токсических эффектов островкового амилоида (Фиг. 7), при восстановлении нарушения толерантности к глюкозе, индуцируемого hIAPP (Фиг. 8),
при увеличении секреции инсулина (Фиг. 7), при снижении уровня глюкозы натощак
25 (Фиг. 8) и нормализации прибавки веса тела (Фиг. 8). Таким образом, молекула, связывающая IAPP, согласно настоящему изобретению, в частности, полезна при лечении субъекта, страдающего от или имеющего риск развития сахарного диабета 2 типа (T2D) и/или гипертензии, которые обычно связаны с одним или несколькими
указанными выше медицинскими показаниями.

30

В этом контексте, предварительные результаты экспериментов, выполненных в соответствии с настоящим изобретением, означают, что защита β -клеток достигается независимо от удаления отложений островкового амилоида. Таким образом, антагонистический эффект молекулы, связывающей hIAPP, в отношении IAPP согласно

настоящему изобретению не может быть в действительности обусловлен выведением фибрилл IAPP и/или предотвращением образования фибрилл IAPP, что считалось необходимым в уровне техники для терапевтической пользы антидиабетического агента, специфического для IAPP. Эти наблюдения сравниваются с наблюдениями, известными в отношении эксендина-4, утвержденного в качестве лекарственного средства (Эксенатид; Баета) для лечения сахарного диабета 2 типа по той причине, что эксендин-4 увеличивает отложение островкового амилоида, но компенсирует возникающую в результате токсичность β -клеток в островках островкового амилоидного полипептида человека у трансгенных мышей; см. Aston-Mourney *et al.*, *Diabetologia* 54 (2011), 1756-1765). Соответственно, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения, защита β -клеток опосредуется молекулой, связывающей IAPP, не имеющей отношения к островковому амилоидозу у субъекта.

В дальнейших экспериментах, выполненных в соответствии с настоящим изобретением, может быть показано, что молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению, то есть рассматриваемое антитело NI-203.26C11, способна к связыванию агрегированных структур на ранних фазах их развития; см. Пример 5. В частности, рассматриваемое антитело NI-203.26C11 связывается с первичными структурами, которые демонстрируют всего лишь фибриллярные характеристики, то есть белки, которые собираются для формирования нерастворимых волокон, но не обладают фибриллярной морфологией, все же могут быть обнаружены молекулой, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению; см. Фиг. 9. Соответственно, в одном из вариантов реализации молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению является подходящей и используемой, соответственно, для раннего обнаружения фибриллярных структур IAPP. В предпочтительном варианте молекула, связывающая IAPP, распознает агрегаты hIAPP, когда происходит первая сборка hIAPP.

Из-за свойства рассматриваемого антитела связывать ранние фибриллярные структуры, в одном из вариантов реализации молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению используется для лечения, защиты и/или устранения клеточного повреждения, индуцируемого hIAPP, токсических эффектов островкового амилоида и/или для восстановления нарушения толерантности к глюкозе, индуцируемого hIAPP, на ранних фазах развития фибрилл. Таким образом, молекула, связывающая hIAPP, в соответствии с настоящим изобретением селективно связывает преимущественно

ранние фибриллярные агрегированные hIAPP в ткани поджелудочной железы субъекта, представляющего собой человека, имеющего диабет.

5 При нарушении толерантности к глюкозе, в то время как гликемия натощак находится в референсном интервале, период после приема пищи характеризуется быстрым и значительным увеличением содержания глюкозы в крови. Этот аномально высокий уровень глюкозы (уровень сахара в крови) является характеристикой гипергликемии, отличительным признаком диабета. Как представлено в Примерах 6 и 7 и показано на Фиг. 8 и 10, введение рассматриваемого антитела к hIAPP трансгенным по hIAPP животным нормализует уровень глюкозы в крови и, таким образом, может быть полезно в профилактике или лечении гипергликемии. Таким образом, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения молекула, связывающая hIAPP, используется для нормализации уровня глюкозы в крови. Более того, а также представлено на Примере 6 и показано на Фиг. 8, введение субъектного антитела к hIAPP ведет к нормализации прибавки массы тела, связанной с hIAPP, в модели на животных. Следовательно, в одном из вариантов реализации hIAPP-связывающая молекула используется для нормализации массы тела, обычно связанная с hIAPP.

В принципе, любую молекулу, связывающую hIAPP и взаимодействующую с ним, соответственно, которая селективно связывает агрегированный hIAPP в ткани поджелудочной железы больного диабетом человека, можно использовать согласно настоящему изобретению. Термин «молекула, связывающая hIAPP», в соответствии с настоящим изобретением предназначен охватить любые предшествующие и индивидуальные компоненты молекулы. Например, если молекула, связывающая hIAPP, 25 указанная в настоящем изобретении, является пептидом, полипептидом или белком, таким как антитело, производным от IAPP или пептидным ингибитором, то соответствующий термин также включает полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, вектор, в частности, вектор экспрессии, включающий в себя кодирующую последовательность молекулы, а также клетку-хозяин, содержащую полинуклеотид или вектор. Соединение-кандидат, специфически связывающее hIAPP в ткани 30 поджелудочной железы при диабете, можно определить, как показано на Фиг. 2 и 3 и согласно Примеру 1, и проверку соединения из числа кандидатов можно выполнить на новой модели на животных согласно настоящему изобретению, как приведено в Примерах 1 и 3. Однако в случае определения малых органических молекул их

взаимодействие с hIAPP на/в ткани поджелудочной железы может быть трудоемким. Вместо этого специалист в данной области техники может полагаться на анализы биохимического связывания и способы аффинного мечения, известные в области техники; см., например, Lomenick *et al.*, Идентификация прямых белковых мишеней малых молекул в ACS Chem. Biol. (2011), 34–46 and Jiang *et al.*, Structure-based discovery of fiber-binding compounds that reduce the cytotoxicity of amyloid beta in eLife 2013;2:e00857; опубликованные онлайн. Далее положительные данные можно непосредственно использовать на модели на животных согласно настоящему изобретению.

10

"Связывающая молекула", используемая в контексте настоящего изобретения, относится в первую очередь к антителам, а также их фрагментам, но может также относиться к другим молекулам, не являющимися антителами, которые селективно и дозо-зависимо распознают патологические агрегаты hIAPP в поджелудочной железе пациентов, у которых диагностирован сахарный диабет 2 типа (T2D), и проявляют функциональные свойства антитела NI-203.26C11, приведенного в примерах, включая но не ограничиваясь, гормонами, рецепторами, лигандами, молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), шаперонами, такими как белки теплового шока (HSPs), а также молекулами адгезии клетка-клетка, такими как члены иммуноглобулинового (Ig) суперсемейства кадгерин, интегрин, лектин типа C, и в частности сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPs), которые являются перспективным классом неиммуноглобулиновых белков, которые могут обеспечивать преимущества над антителами при целевом связывании; см. обзор, например, Stumpp and Amstutz, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10 (2007), 153-159, и ссылки, приводимые здесь. Таким образом, только для большей ясности и отсутствия ограничивающих рамок настоящего изобретения большинство последующих вариантов реализации описаны в отношении антител и молекул, подобных антителам, которые предпочтительно представляют собой связывающие молекулы в целях развития терапевтических агентов. Антитела или антиген-связывающие фрагменты, иммуноспецифические фрагменты, их варианты или производные, в соответствии с изобретением включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, мыши, человека, гуманизированные, приматизированные, муринизированные и химерные антитела, рекомбинантное полноразмерное антитело (иммуноглобулин), в частности моноклональное рекомбинантное полноразмерное антитело (иммуноглобулин),

30

одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие или VL или VH домены, фрагменты, образованные с помощью библиотеки экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам, описанных здесь), химерное антитело, CDR-привитое антитело, бивалентное антитело-конструкт, синтетическое антитело, кросс-клонированное антитело, полноразмерное антитело человека, человекоподобное антитело, ксеногенное или химерное антитело человека и мыши, нанотела, диатела и тому подобное. Молекулы ScFv известны в области техники и описаны, например, в патенте США 5,892,019. Иммуноглобулин или молекулы антител изобретения могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса иммуноглобулиновых молекул.

15 В предпочтительном варианте настоящего изобретения молекула, связывающая hIAPP, обладает иммунологической активностью, так как она поддается гистохимическому окрашиванию, таким образом, позволяя легко идентифицировать связывание с тканью поджелудочной железы, полученной от пациентов, которая содержит агрегаты IAPP. Соответственно, в конкретном примере осуществления изобретения настоящего изобретения молекула, связывающая hIAPP, представляет собой антитело к hIAPP или его фрагмент, связывающий hIAPP. Наиболее предпочтительным антителом является антитело человеческого происхождения. Молекулы, связывающие hIAPP, согласно настоящему изобретению можно идентифицировать и охарактеризовать *in vitro*, клонировать и получить рекомбинантным путем с помощью технологии Neurimmune's RTM™, детально описанной в международной заявке WO2008/081008. В дополнение или в качестве альтернативы процесс скрининга на наличие и сродство молекул, связывающих hIAPP, может включать в себя этапы чувствительного анализа иммунореактивности к амилоидной бляшке в ткани (TAPIR), как описано в международной заявке WO2004/095031, раскрытие содержания которой включено в настоящее описание в виде ссылки, и осуществлено в настоящей заявке по аналогии для амилоидных отложений в панкреатических островках.

Предпочтительно, антитела человека к hIAPP для применения в соответствии с настоящим изобретением получали от группы здоровых людей или от группы пациентов, страдающих ожирением, и других групп пациентов с повышенным риском развития

сахарного диабета 2 типа, которые на момент выделения антител не показывали явных признаков T2D, за исключением отложения амилоида и проявления специфической иммунной реакции против IAPP. Такие антитела человеческого происхождения также могут быть обозначены как "аутоантитела человека" для того, чтобы подчеркнуть, что в действительности эти антитела первоначально были экспрессированы у людей и не являются конструктами, подобранными *in vitro*, которые получены, например, с помощью фаговых библиотек, экспрессирующих иммуноглобулин человека или ксеногенных антител, произведенных в трансгенном животном, экспрессирующим часть репертуара иммуноглобулинов человека, что до сих пор представляет собой наиболее стандартный способ при попытках получить антитела, подобные антителу человека. С другой стороны, антителом человеческого происхождения в соответствии с настоящим изобретением может быть обозначено как синтетическое, так рекомбинантное и/или биотехнологическое антитело, чтобы отличить его по сути от сывороточных антител человека, которые могут быть очищены с помощью протеина А или аффинной колонки.

15

В предпочтительном варианте настоящего изобретения, молекула, связывающая hIAPP, получена из моноклонального антитела к hIAPP человеческого происхождения, раскрытого в международной совместно рассматриваемой заявке WO2014/041069 заявителя, раскрытие содержания которой вставлено в настоящий документ в виде ссылки, в частности в отношении аминокислотных последовательностей антител к hIAPP, их CDR и вариабельной области, рекомбинантного получения антител к hIAPP, а также в виде примеров, описывающих анализы, пригодные для тестирования иммунологической и биологической активности антител к IAPP и эквивалентных антител. Кроме того, если не указано иное, терминам, используемым здесь как "IAPP" и "CDR", в настоящей заявке дается определение в соответствии с тем, как это предусмотрено в международной заявке WO2014/041069, см. выше.

Как показано в приведенных ниже примерах, настоящее изобретение проиллюстрировано антителом к hIAPP человеческого происхождения NI-203.26C11. Специфичность связывания антитела в основном определяется его доменом связывания, содержащим вариабельный участок тяжелой и легкой цепи, и в частности одним или более участками, определяющими комплементарность (CDRs), содержащимися в нем. Как известно в области техники, мутации в каркасном участке и/или в CDR могут не влиять существенно на специфичность связывания, но даже могут усиливать

30

аффинность. Например, специалисту в данной области техники известно, что аффинность связывания можно усилить путем замены аминокислоты внутри CDR или внутри гипервариабельных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917), которые частично перекрываются с CDR, как определено у Kabat; см., например, Riechmann, *et al*,
 5 Nature 332 (1988), 323-327. Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителам, где один или более из CDR исходного антитела содержит по меньшей мере одну или более, предпочтительно не более двух, аминокислотную замену.

Таким образом, в одном из вариантов реализации любая из вышеописанных молекул, связывающих hIAPP, согласно настоящему изобретению содержит в своем связывающем домене

- (a) по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR) тяжелой цепи (VH) и/или аминокислотную последовательность участка легкой цепи (VL), как обозначено на Фигуре 1 (SEQ ID NOs: 1, 3, и 5);
- 15 (b) аминокислотную последовательность регионов VH и/или VL, как показано на Фиг. 1;
- (c) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной путем частичных перестроек любой из аминокислотных последовательностей согласно (a); и/или
- 20 (d) тяжелую цепь и/или легкую вариабельную область, содержащую аминокислотную последовательность, полученную путем частичной перестройки любой из аминокислотных последовательностей согласно (b).

Антитело NI-203.26C11 является одним из антител к IAPP, описанным в указанной выше
 25 международной заявке WO2014/041069. Анализ связывающих эпитопов IAPP рекомбинантных антител человека с помощью perscan, описанных здесь, выявил последовательность в IAPP человека, включающую 2-CNTATCA-8 (SEQ ID NO: 7), как уникальный линейный эпитоп, узнаваемый антителом NI-203.26C11. Последние экспериментальные данные точного картирования эпитопов антитела NI-203.26C11
 30 выявили, что NI-203.26C11 связывает N-терминальный конец hIAPP, при этом аминокислоты 2, 3, 4, и 7 играют критическую роль. В частности, присутствие аминокислот 2 и 7, по-видимому, является необходимым для связывания, так как, например, отсутствие или мутация во втором положении аминокислоты в значительной степени устраняет связывание антитела NI-203.26C11 с IAPP. Следовательно, для того,

чтобы определить антитела к IAPP, которые эквивалентны антителу NI-203.26C11, помимо распространенного анализа конкурентного связывания могут быть применены анализы на связывание с антигеном, в частности ELISA, для определения, обладает ли данное антитело к hIAPP в по существу предпочтением в связывании, т.е. 2-CNTATCA-8 (SEQ ID NO: 7) с указанными обязательными позициями аминокислот.

Предпочтительно молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению содержит в одной или в обеих ее иммуноглобулиновых цепях два или все три CDR переменных областей, как приведено на Фиг. 1.

10

В предпочтительном варианте настоящего изобретения молекула, связывающая hIAPP, такая как антитело к hIAPP, кодируется полинуклеотидом, который содержит, по существу состоит из, или состоит из нуклеиновой кислоты, имеющей полинуклеотидную последовательность регионов V_H или V_L антитела к IAPP, как описано в Таблице I. В связи с этим специалист в данной области техники будет с легкостью понимать, что полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере переменный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать переменный домен двух иммуноглобулиновых цепей или только одну. В одном из вариантов реализации, следовательно, полинуклеотиды содержат, преимущественно состоят из, или состоят из нуклеиновой кислоты, имеющей полинуклеотидную последовательность регионов V_H и V_L антитела к IAPP согласно таблице I.

20

Таблица I: Нуклеотидные последовательности регионов V_H и V_L антитела к hIAPP.

Антитело	Нуклеотидные последовательности переменной тяжелой (V_H) и переменной легкой (V_L/V_K) цепей
NI-203.26C11- V_H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGATTGGTGAAGCCTTCTC AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGT GGTAATTAATACTGGACCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGAAGGGA CTGGAGTGGATTGGGCATATCTATTCCAGTGGGACCACCAATTACA ACCCCTCCCTCGAGAGTCGAGTCACCATTTTCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAGCCTGAACTCTGTGACCGCCGCAGACACG GCCGTTTATTAATACTGTGCGAGACCACTGGCTACAGTTCCGGATGCTTT TAATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 1
NI-203.26C11- V_K	GAAATTGTGATGACTCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCAAGTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATAC AGCAATAAGAATACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC CTCCTAAATACTCATTTACTGGGCATCTACTCGGGAATCCGGGGTC CCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTACTGTCA

	GCAGTATTATAGTAATCCTAACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTG GAGATCAAA SEQ ID NO: 3
NI-203.26C11- PIMC V _K	GATATTGTGATGACTCAATCACCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGAGGGCCACCATCAAGTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATAC AGCAATAAGAACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGC CTCCTAAATTACTCATTTACTGGGCATCTACTCGGGAATCCGGGGTC CCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCA GCAGTATTATAGTAATCCTAACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAAG SEQ ID NO: 5

В качестве альтернативы для применения в соответствии с настоящим изобретением молекула, связывающая hIAPP, конкурирует за связывание с агрегатами hIAPP в ткани поджелудочной железы с антителом, имеющим области VH и VL, как обозначено на Фиг.

- 5 1. Эти молекулы, связывающие hIAPP, могут быть антителами, как например, антителами мыши, гуманизированными, ксеногенными, химерными антителами человека и - мыши или предпочтительно антителами человеческого происхождения, в частности для терапевтического применения. Однако в целом антитела мыши также являются подходящими для диагностических целей и исследования. Антиген-
10 связывающий фрагмент антитела может быть, например, одноцепочечным фрагментом Fv (scFv), фрагментом F(ab'), фрагментом F(ab) и фрагментом F(ab')₂. Для некоторых областей применения требуются только переменные регионы антител, которые можно получить путем обработки антител подходящими реагентами так, чтобы образовать части Fab', Fab, или F(ab')₂. Такие фрагменты являются необходимыми в применении,
15 как например, в иммунодиагностических процедурах, подразумевающих связывание иммуноспецифических частей иммуноглобулинов с детектирующими реагентами, такими как радиоизотопы.

20 Типичная молекула, связывающая hIAPP, например, антитело к IAPP, также может быть не предназначена для распознавания патологического отложения Aβ в мозге человека с болезнью Альцгеймера. Следовательно, в одном из вариантов реализации молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению не распознает патологические отложения Aβ в мозге человека с болезнью Альцгеймера.

25 В одном из вариантов реализации настоящего изобретения молекула, связывающая hIAPP, состоит из полипептидной последовательности, которая гетерологична домену, связывающему hIAPP, т.е. областям VH и/или VL и/или по меньшей мере одному CDR.

Гетерологичные полипепетидные последовательности содержат, но не ограничиваются ими, домены связывания различной специфичности, пептидные линкеры, пептидные метки, N- и C-концевые части пептидов, домены Fc и тому подобное, отдельно или в комбинации. Безусловно, в дополнение или в качестве альтернативы молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению может содержать непептидные части, такие как полиэтиленгликоль, который может быть присоединен с помощью химических или биохимических способов и способов *in vitro*.

Для использования в соответствии с настоящим изобретением молекула, связывающая hIAPP, или ее соответствующая(ие) иммуноглобулиновая(ые) цепь(и) могут быть в дальнейшем модифицированы, с использованием традиционных способов, известных в данной области техники, например, путем аминокислотных делеции(й), инсерции(й), замещения(й), добавления(й) и/или рекомбинации(й) и/или любой(ых) другой(их) модификации(й), известных в данной области техники либо отдельно, либо в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности иммуноглобулиновой цепи, хорошо известны специалисту в данной области техники, см., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (1989) и Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Модификации антитела согласно настоящему изобретению включают химические и/или энзиматические производные одной или более входящих в его состав аминокислот, включая модификации боковой цепи, модификации остова, и модификации N- и C-терминальных концов, включая ацетилирование, гидроксילирование, метилирование, амидирование и присоединение или удаление углеводных или липидных групп, ко-факторов и тому подобное. Кроме того, настоящее изобретение охватывает получение химерных белков, которые содержат описанное антитело или часть его фрагмента на амино-конце, слитого с гетерологичной молекулой, такой как иммуностимулирующий лиганд на карбоксильном конце; см., например, международную заявку WO 00/30680 для соответствующих технических деталей.

30

В предпочтительном варианте реализации молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению содержит константный домен или его часть, которая гетерологична связывающему домену, например, региону VH и/или VL и/или по меньшей мере одному CDR, где предпочтительно константный домен является

константным доменом человека. Предпочтительно константный домен представляет собой константный домен типа IgG, предпочтительно класса или изотипа IgG1; см., например, Kipriyanov and Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26 (2004), 39-60; Chan and Carter, *Nature Reviews Immunology* 10 (2010), 301-316; Vincent and Zurini, *Biotechnol J.* 7 (2012), 1444-1450.

Следовательно, настоящее изобретение относится к любой молекуле, связывающей hIAPP, как описано и определено выше, имеющей функциональные и биологические свойства, которые делают молекулу подходящей для защиты β -клеток от клеточного повреждения, индуцируемого hIAPP, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или для восстановления нарушения толерантности к глюкозе, индуцируемого hIAPP, у субъекта, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации настоящего изобретения, молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой детектируемую метку или иным способом связанной с функциональной группой. Агенты для мечения могут быть связаны или прямо или опосредованно молекулой, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению. Одним из примеров непрямого связывания является использование спейсерной группы. Более того, молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению может содержать дополнительный домен, боковой домен, связанный ковалентными или не ковалентными связями. Связь может быть основана на генетическом слиянии согласно способам, известным в области техники и описанным выше, или могут быть осуществлена, например, путем химического перекрестного связывания, как описано, например, в международной заявке WO94/04686. Дополнительный домен, присутствующий в слитом белке, содержащем молекулу, связывающую hIAPP, согласно изобретению, может предпочтительно связываться гибким линкером, преимущественно полипептидным линкером, при этом указанный полипептидный линкер содержит многочисленные, гидрофильные, пептид-связанные аминокислоты, длиной, необходимой для перекрытия расстояния между C-терминальным концом указанного дополнительного домена и N-терминальным концом молекулы, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению, или наоборот. Терапевтически или диагностически активный агент может быть связан с молекулой, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению различными способами. Это включает в себя, например, одноцепочечные слитые белки,

содержащие переменные области антитела к hIAPP согласно изобретению, соединенные ковалентными способами, такими как пептидные связи, с терапевтически или диагностически активным агентом. Другие примеры включают молекулы, которые содержат по меньшей мере антиген-связывающий фрагмент, ковалентно или не

5 ковалентно связанный с дополнительными молекулами, включая такие, которые описаны в следующем неограничивающемся иллюстративном перечне. Traunecker, *Int. J. Cancer Surv. SuDP* 7 (1992), 51-52, описывает биспецифический реагент янусин (janusin), в котором область Fv, направленная на CD3, соединена с растворимым CD4 или с другими лигандами, такими как OVCA и IL-7. Аналогично, переменные области

10 антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать в состав молекул Fv и соединить с альтернативными лигандами, такими как указанные в цитируемой статье. Higgins, *J. Infect. Dis.* 166 (1992), 198-202, описал гетероконъюгированное антитело, состоящее из ОКТ3, связанного прекрестными связями с антителом, направленное на специфическую последовательность в V3 области GP120. Такие

15 гетероконъюгированные антитела можно сконструировать, используя по меньшей мере переменные участки, содержащиеся в антителе к hIAPP согласно способам настоящего изобретения. Дополнительные примеры специфических антител включают описанные у Fanger, *Cancer Treat. Res.* 68 (1993), 181-194 and by Fanger, *Crit. Rev. Immunol.* 12 (1992), 101-124. Конъюгаты, которые представляют собой иммунотоксины, включая обычные

20 антитела, были широко описаны в данной области техники. Токсины могут быть связаны с антителами с помощью обычных способов связывания, или иммунотоксины, содержащие части белкового токсина, могут быть получены в виде слитых белков. Антитела согласно настоящему изобретению можно применять соответствующим образом для получения таких иммунотоксинов. Примеры подобных иммунотоксинов

25 описаны у Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 и у Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

Вышеописанный слитый белок может дополнительно включать отщепляемый линкер или сайт расщепления протеазами. Эти спейсерные молекулы, в свою очередь, могут

30 быть либо нерастворимыми, либо растворимыми (Diener *et al.*, *Science* 231 (1986), 148) и их можно выбрать, чтобы обеспечить высвобождение лекарственного средства из антитела к hIAPP в целевом месте. Примерами терапевтических агентов, которых можно соединить с антителами для иммунотерапии согласно настоящему изобретению, являются лекарственные средства, радиоизотопы, лектины и токсины. Лекарственные

препараты, которые могут быть конъюгированы с антителами и антигенами согласно настоящему изобретению, включают соединения, которые классически относятся к лекарственным средствам, таким как митомицин С, даунорубицин и винбластин. Для применения антител и антигенов согласно настоящему изобретению, конъюгированных с радиоактивными изотопами, например, для иммунотерапии, некоторые изотопы могут быть более предпочтительными, чем другие, в зависимости от таких факторов как распределение лейкоцитов, а также стабильность и излучение. В зависимости от аутоиммунного ответа некоторые излучатели могут быть более предпочтительными по сравнению с другими. Как правило, радиоактивные изотопы, излучающие α и β частицы, являются предпочтительными для иммунотерапии. Предпочтительными являются излучателями с малой дальностью и высокой энергией, такие как ^{212}Bi . Примеры радиоизотопов, которые можно связать с антителами или антигенами согласно настоящему изобретению, для терапевтических целей ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd и ^{188}Re . Наиболее предпочтительным является радиоактивно меченный ^{64}Cu .

Другие терапевтические агенты, которые можно связать с антителом или антигеном согласно настоящему изобретению, а также терапевтические протоколы *ex vivo* и *in vivo*, известны или могут быть легко установлены рядовыми специалистами в данной области техники. Всегда, когда это уместно, специалист в данной области техники может применить полинуклеотид, кодирующий молекулу, связывающую hIAPP, согласно настоящему изобретению взамен самого белкового материала.

В одном из вариантов реализации молекула, связывающая hIAPP, описанная в настоящей заявке, (а) помечена поддающейся детектированию меткой, при этом предпочтительно указанная детектируемая метка выбрана из группы, содержащей фермент, радиоизотоп, флуорофор, ядерный магнитный и тяжелый металл; или связана с лекарственным средством (b).

Для фармацевтического применения молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению сформулирована в форме фармацевтической композиции; необязательно дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно молекула, связывающая hIAPP, предназначена для введения подкожно (п.к.), внутримышечно (в.м.), или внутривенно (в.в.); и/или один раз в неделю, раз в две недели или ежемесячно. В одном из вариантов реализации молекула, связывающая hIAPP, предназначена для введения до или после появления островковых амилоидных

фибрилл, протофибрил и/или амилоидной бляшки в ткани поджелудочной железы. Как можно показать на Примере 2 и Фиг. 4, нарушение толерантности к глюкозе предшествует отложению островковых амилоидов в трансгенной модели на мышях с сахарным диабетом 2 типа (мышь, трансгенная по hIAPP). Таким образом, субъекта, страдающего от нарушения толерантности к глюкозе и/или показывающего аберрантную экспрессию hIAPP по сравнению со здоровым субъектом, уже можно лечить при отсутствии амилоидной бляшки IAPP или образования фибрилл в панкреатическом островке, таким образом, предотвращая возникновение более пагубных медицинских симптомов диабета.

10

В одном из вариантов реализации молекулы, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция дополнительно содержит агент, способный предотвращать или уменьшать образование IAPP амилоида, при этом предпочтительно указанный агент выбран из группы, состоящей из флавоноидов, аналогов IAPP, метформина и тиазолидиндионов, таких как росиглитазон; см., например, Cao and Raleigh, *Biochemistry* 51 (2012), 2670–2683; Noor *et al.*, *Protein Sci.* 21 (2012), 373–382; Yan *et al.*, *PNAS* 103 (2006), 2046–2051; and Hull *et al.*, *Diabetes* 54 (2005), 2235–2244. В качестве альтернативы, молекула, связывающая hIAPP, согласно настоящему изобретению может быть предназначена для совместного введения, т.е. одновременно до, в сочетании или после введения такого агента субъекту. Например, пациент с диабетом может уже получать лечение антидиабетическим лекарством, которое, однако, не доказало свою эффективность и/или успешность в устранении всех медицинских показаний и симптомов, соответственно. В этом случае предшествующее лечение может быть дополнено введением молекулы, связывающей hIAPP, согласно настоящему изобретению. Комбинированная терапия является особенно предпочтительной во время прогрессирования заболевания. В контексте настоящей заявки "совместное введение" двух или более соединений определяется как введение двух или более соединений пациенту в течение 24 ч, включая раздельное введение двух лекарств, каждое из которых содержит одно из соединений, а также одновременное введение двух объединенных или нет соединений в одну композицию или находящихся в двух отдельных композициях. "Синергический эффект" двух соединений с точки зрения статистического анализ представляет собой эффект, который больше, чем аддитивный эффект, который происходит от суммы эффектов двух отдельных соединений.

20
25
30

Является ли рассматриваемая молекула, связывающая hIAPP, терапевтически эффективной при применении согласно настоящему изобретению, можно определить с помощью модели на животных согласно настоящему изобретению, как раскрыто в прилагаемых примерах. Предпочтительно, молекула, связывающая hIAPP, является эффективной, при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг в трансгенной по hIAPP модели на мышах и/или 3 мг/кг в трансгенной по hIAPP модели на крысах в отношении антитела IgG против hIAPP. Соответственно, в случае применения фрагментов, связывающих hIAPP, таких как одноцепочечные антитела или применяя малые органические молекулы, дозировку можно регулировать в зависимости от молекулярной массы антитела.

Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 0.001 до 1000 мкг (или нуклеиновой кислоты для экспрессии или для ингибирования экспрессии в этом диапазоне); однако, предусмотрены дозы ниже или выше этого приблизительного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов. Как правило, доза может находиться, например, в диапазоне приблизительно от 0.0001 до 100 мг/кг, и чаще от 0.01 до 5 мг/кг (например, 0.02 мг/кг, 0.25 мг/кг, 0.5 мг/кг, 0.75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т.д.) от массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в диапазоне 1-10 мг/кг, предпочтительно, по меньшей мере 1 мг/кг. Промежуточные дозы в указанных диапазонах также входят в объем настоящего изобретения. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, по чередующимся дням, еженедельно или в соответствии с любым другим графиком, определенным эмпирическим анализом. В качестве примера, лечение включает введение в нескольких дозах в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные схемы лечения, в качестве примера, предполагают введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Схемы примерных дозировок включают 1-10 мг/кг или 15 мг/кг следующие подряд дни, 30 мг/кг в чередующиеся дни или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах два или более моноклональных антител с различными специфичностями связывания вводят одновременно, и в этом случае доза каждого вводимого находится в пределах указанных диапазонов. Прогресс можно контролировать периодической оценкой. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются триполифосфат, полиэтиленгликоль, растительные масла, такое как оливковое масло, и органические

сложные эфиры для инъекций, такое как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии и суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла.

5 Внутривенные носители включают жидкие и питательные наполнители, электролитные наполнители (такие как на основе декстрозы Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п.

10 Термины "субъект" и "пациент", используемые в данной заявке, означают индивидуума, нуждающегося в лечении метаболического расстройства. Предпочтительно субъект представляет собой млекопитающее, в особенности предпочтительно, человека.

Термины "лечение", "лечить" и т.п. в данной заявке, как правило, означают получение
15 желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в контексте полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в контексте частичного или полного излечения от заболевания или нежелательного действия, относящегося к заболеванию. Термины "лечить" или "лечение" в данной заявке относятся как к
20 терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам, где объектом является предотвращение или замедление (понижение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие или распространение заболевания обмена веществ. Благотворные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов,
25 уменьшение тяжести заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшение) состояние болезни, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния (частичное или полное) и ремиссию (частичную или полную), детектируемую или не детектируемую. "Лечение" может также означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при
30 отсутствии лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет патологическое состояние или имеет расстройство, а также тех, кто подвержен патологическому состоянию или расстройству, или тех, у кого необходимо предотвратить проявление патологического состояния или расстройства.

Для применения в форме фармацевтической композиции молекулу, связывающую hIAPP, согласно настоящему изобретению, необязательно объединенную с другими активными агентами, можно объединить с одним или несколькими стандартными инертными носителями и/или растворителями. Фармацевтически приемлемые носители и способы введения можно узнать из соответствующей литературы, известной специалисту в данной области техники. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут входить в состав лекарственной формы согласно способам, хорошо известным в данной области техники, см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols, 2nd Edition by Robinson *et al.*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Примеры подходящих фармацевтических носителей, известных в области техники, включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло в воде, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, можно включить в состав лекарственной формы с помощью обычных хорошо известных способов. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществить различными путями. Примеры включают в себя введение композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, пероральным, интраназальным, ректальным, топическим, внутрибрюшинным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, субдермальным, трансдермальным, интратекальным и внутричерепным путем. Формы фармацевтических композиций для перорального введения, такие как однодоменные молекулы антител (т.е. "нанотела", "nanobodiesTM") и т.д., также предусмотрены в настоящем изобретении. Такие пероральные композиции могут быть изготовлены в форме таблетки, капсулы, порошка, жидкости или полутвердой форме. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Дальнейшее руководство относительно составов, которые подходят для различных типов введения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) и соответствующих обновленных редакциях. См. краткий обзор способов доставки лекарственных средств Langer, Science 249 (1990), 1527-1533. В одном из вариантов реализации молекулу, связывающую hIAPP, и состав согласно настоящему изобретению вводят пациенту, представляющему собой человека,

один раз в день, каждый день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю, предпочтительно меньше одного раза в день.

- Как указывалось выше, дополнительный аспект настоящего изобретения относится к трансгенному животному, не являющемуся человеком, для применения в определении, способно ли исследуемое соединение защищать β -клетки от повреждения, индуцируемого hIAPP, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или восстанавливать нарушение толерантности к глюкозе, индуцируемое hIAPP; при этом указанное животное характеризуется способностью к экспрессии по меньшей мере одного трансгена, содержащего последовательность ДНК, кодирующую островковый амилоидный полипептид человека (hIAPP), и
- (i) спонтанно развивающимся диабетом, характеризующимся нарушением толерантности к глюкозе и/или гипергликемией приблизительно в возрасте одного и двух месяцев, соответственно; и/или
 - (ii) появлением внеклеточных амилоидных отложений приблизительно в двух месячном возрасте и/или обширного амилоидоза, связанного с потерей β -клеток приблизительно в возрасте четырех месяцев; см. Пример 4 и Фиг. 4.

Предпочтительно исследуемое соединение является молекулой, связывающей hIAPP, как было определено ранее в заявке.

Как описано в Примере последовательность ДНК, кодирующая hIAPP, предпочтительно функционально связана с промотором инсулина II крысы. Более того, трансгенное животное согласно настоящему изобретению предпочтительно является гемизиготой; см., например, Cho *et al.*, Curr Protoc Cell Biol. (2009), Chapter: unit-19.11; Haruyama *et al.*, Curr Protoc Cell Biol. (2009), Chapter: unit-19.11.

Эти и другие варианты реализации раскрыты и охвачены описанием и примерами согласно настоящему изобретению. Дополнительную литературу, касающуюся любого из материалов, способов, применений и соединений которые нужно использовать в соответствии с настоящим изобретением, можно получить из публичных библиотек и баз данных, применяя например электронные устройства. Например, можно использовать общедоступную базу данных "Medline", которая организована Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) и/или Национальную

- библиотеку медицины (NLM) на сайте Национальных институтов здравоохранения (NIH). Дополнительные базы данных и web-адреса, такие как у Европейского института биоинформатики (EBI), который является частью Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), известны специалисту в области техники, и их также можно найти, применяя поисковые службы интернета. Обзор патентной информации по биотехнологии и обзор важных источников патентной информации, полезных для ретроспективного поиска и для текущей осведомленности, представлен у Berks, TIVTESH 12 (1994), 352-364.
- 10 Некоторые документы процитированы на всем протяжении текста данного описания. Содержание всех цитируемых ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные заявки на патент, которые цитируются на всем протяжении настоящей заявки и описания, инструкции производителя и т.д.) настоящим специально включено в настоящий документ посредством ссылки; однако не признается
- 15 действительным то, что любой цитируемый документ действительно представляет собой уровень техники в отношении настоящего изобретения.

Более полное понимание может быть достигнуто с помощью рассмотрения следующих конкретных примеров и фигур, которые приведены в данной заявке исключительно с целью иллюстрирования и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

20

ОПИСАНИЕ ФИГУР

- 25 **Фиг. 1:** Последовательности аминокислот переменного участка, т.е. тяжелой цепи и легкой каппа цепи антитела NI-203.26C11 к IAPP человека. Каркасный участок (FR) и участки, определяющие комплементарность (CDRs) обозначены в виде подчеркнутых CDRs. Также показаны соединяющий участок тяжелой цепи (JH) и соединяющий участок легкой цепи (JK). Благодаря стратегии клонирования аминокислотная последовательность на N-конце тяжелой цепи и легкой цепи может потенциально содержать праймер-индуцированные изменения в FR1, которые, однако, не оказывают существенного влияния на биологическую
- 30 активность антитела. Чтобы предоставить консенсусную последовательность антитела человека, нуклеотидная и аминокислотная последовательности

исходного клона были выровнены и настроены в соответствии с подходящими последовательностями переменного участка зародышевой линии человека в базе данных; см., например, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), организованной MRC Центра белковой инженерии (Кембридж, Великобритания). Аминокислотная последовательность антител человека указывается, когда N-концевые аминокислоты, как полагают, потенциально отклоняются от консенсусной последовательности зародышевой линии посредством ПЦР-праймера и таким образом замещаются праймер-индуцированной мутационной коррекцией (PIMC).

10

Фиг. 2: Антитело NI-203.26C11 селективно или дозо-зависимо распознает патологические агрегаты hIAPP в поджелудочной железе пациентов, имеющих диагностируемый сахарный диабет 2 типа (T2D). Окрашивание тиофлавином S (ТиоS, левые панели, зеленый) островкового амилоида в панкреатических островках пациентов, имеющих T2D, но не в здоровом контроле. Антитело NI-203.26C11 показывает окрашивание в панкреатических островках пациентов, имеющих T2D, нагруженных островковыми амилоидами (Субъекты 1 и 2), но не в контрольных здоровых панкреатических островках, у которых отсутствуют островковые амилоиды (Субъекты 3 и 4). Обнаружение агрегатов hIAPP в панкреатических островках, положительных по амилоиду, связанному с T2D, с помощью рекомбинантного химерного антитела мыши NI-203.26C11 (NI-203.26C11-ch; коричневый) в 3, 10, 30 нМ (сильное окрашивание), и 1 нМ (слабое окрашивание). Антитело NI-203.26C11 не распознает физиологический hIAPP в здоровой контрольной поджелудочной железе. Антитело к hIAPP (1:100; anti-IAPP) и вторичное антитело осла против мыши (вторичные антитела против антител мыши) использовали только как положительные и негативные контроли, соответственно. Совместное окрашивание выполняли для визуализации клеточного ядра (слабый синий, т.е. слабое окрашивание здесь). Масштабная линейка: 100 мкм.

15

20

25

30

Фиг. 3: Антитело NI-203.26C11 селективно распознает патологические агрегаты hIAPP у пациентов с T2D. Антитело NI-203.26C11 показывает окрашивание в панкреатических островках с T2D, но не распознает физиологический hIAPP в здоровых контрольных панкреатических островках, не имеющих патологических агрегатов hIAPP. Обнаружение агрегатов hIAPP в

панкреатических островках с T2D с помощью рекомбинантного химерного антитела мыши NI-203.26C11 (NI-203.26C11-ch; синий; 100 нМ; верхние панели). Окрашивание агрегатов hIAPP с помощью NI-203.26C11 ограничено островковыми областями, лишенными β -клеток (нет совмещения с инсулиновым окрашиванием красным). Обнаружение инсулина в островковых β -клетках антителом к инсулину (1:3; красный). Антитело к hIAPP (1:100; anti-IAPP; нижние панели) распознает физиологический hIAPP в β -клетках с T2D и здоровых контрольных панкреатических островковых β -клетках, как показано с помощью совместной локализации с окрашиванием инсулина (совмещение с инсулиновым окрашиванием красным). Масштабная линейка: 50 мкм.

Фиг. 4: Нарушение толерантности к глюкозе предшествует отложению островковых амилоидов в трансгенной модели на мышах с диабетом 2 типа (трансгенные по hIAPP мыши). (А) Островковые амилоиды визуализировали у трансгенных по hIAPP мышей в возрасте 14 недель, но не в 4-недельном возрасте. Мыши дикого типа лишены островковых амилоидов. Репрезентативные образцы панкреатических островков от мышей, трансгенных по hIAPP, и мышей дикого типа окрашивали против островковых амилоидов (0.1% ТiuS), инсулина (антитело к инсулину; 1:3; красный) и глюкагона (антитело против глюкагона; 1:2500; синий). (Б) Нарушение толерантности к глюкозе у 4-недельных и 14-недельных трансгенных мышей. Уровни глюкозы в крови во время перорального глюкозотолерантного теста (oGTT) выполняли на мышах, трансгенных по hIAPP, и мышах дикого типа в возрасте 4 недель (верхняя панель) и 14 недель (нижняя панель). Уровни глюкозы в крови после приема глюкозы были выше у мышей, трансгенных по hIAPP, по сравнению с мышами дикого типа в возрасте 4 недель (tg, n=13; wt, n=9) и 14 недель (tg, n=27; wt, n=31). Уровни глюкозы в крови натощак были сходными среди 4-недельных групп, но увеличены у мышей 14-недельного возраста, трансгенных по hIAPP. ** p < 0.01 и *** p < 0.001 по сравнению с группой wt. Масштабная линейка: 50 мкм.

Фиг. 5: Антитело NI-203.26C11 селективно связывает агрегаты hIAPP у мышей, трансгенных по hIAPP. NI-203.26C11 показывает окрашивание панкреатических островков у 4-недельных и 16-недельных мышей, трансгенных по hIAPP (синее окрашивание; левые панели), без окрашивания у мышей дикого типа соответствующих возрастов (отсутствие синего окрашивания; правые панели). Обнаружение агрегатов hIAPP в трансгенных островках с помощью рекомбинантного антитела человека NI-203.26C11 (NI-203.26C11; синий; 100 мМ). Обнаружение инсулина в островковых β -клетках с помощью антитела к инсулину (1:3; red). Масштабная линейка: 50 мкм.

Фиг. 6: Антитело NI-203.26C11 метит агрегированный hIAPP после однократного введения мышам, трансгенным по hIAPP. Рекомбинантное антитело человека NI-203.26C11 или изотипный контроль (контрольные IgG) антител вводили 16-недельным мышам, трансгенным по hIAPP, и мышам дикого типа в дозе 10 мг/кг (в.б.), и связывание антитела оценивали на 2 день после введения, используя вторичное антитело против человека. Рекомбинантное антитело человека NI-203.26C11 (коричневое окрашивание здесь) метит трансгенные островки, показывающие TioS-положительные амилоиды (зеленое окрашивание здесь), но не TioS-отрицательные островки дикого типа. Окрашивания контрольными IgG не наблюдалось. Совместное окрашивание выполняли для визуализации клеточных ядер (слабый синий, т.о. слабое окрашивание здесь).

Фиг. 7: Антитело NI-203.26C11 защищает от потери β -клеток у мышей, трансгенных по hIAPP. (А) Репрезентативное изображение панкреатического островка мыши, окрашенного антителом к инсулину для визуализации β -клеток (красный т.о., сильное окрашивание здесь). (Б) Обработка раз в неделю рекомбинантным химерным антителом мыши NI-203.26C11 мышей, трансгенных по hIAPP (tg NI-203.26C11-ch, n=23; 10 мг/кг в.б. в течение 12 недель) увеличивает панкреатический инсулин (инсулин-положительная область в % от панкреатической области и в % от островковой области; верхняя левая и верхняя средняя панели), островковую область (средняя островковая область; верхняя правая панель) и секрецию инсулина (уровни инсулина в плазме; нижняя левая панель) по сравнению с мышами, трансгенными по hIAPP, получавшим ФСБ (tg PBS, n=28). Островковая плотность и панкреатическая масса были неизменными

после обработки NI-203.26C11-ch (нижняя средняя и нижняя правая панели, соответственно). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ по сравнению с tg группой ФСБ. Масштабная линейка: 50 мкм.

5 **Фиг. 8:** Антитело NI-203.26C11 уменьшает уровень глюкозы в крови натощак, улучшает
 10 толерантность к глюкозе и нормализует увеличивающийся вес тела у мышей,
 трансгенных по hIAPP. Рекомбинантное химерное антитело мыши NI-203.26C11
 вводили раз в неделю мышам, трансгенным по hIAPP (tg NI-203.26C11-ch, n=24;
 10 мг/кг в.б.). ФСБ использовали как плацебо (tg PBS, n=27). (А) Антитело NI-
 203.26C11 значительно уменьшает уровень глюкозы в крови натощак через 8 и
 12 недель лечения мышей, трансгенных по hIAPP, по сравнению с группой,
 получавшей ФСБ. Уровни глюкозы в крови измеряли после ночного голодания.
 (Б) Антитело NI-203.26C11 значительно улучшает толерантность к глюкозе у
 15 мышей, трансгенных по hIAPP, по сравнению с группой, получавшей ФСБ.
 Уровни глюкозы в крови в течение перорального глюкозотолерантного теста
 (oGTT) оценивали у мышей, трансгенных по hIAPP, после 10 недель лечения.
 (В) Инкрементальная масса тела (%) была нормализована у трансгенных по
 hIAPP мышей, обработанных NI-203.26C11, через 12 недель лечения по
 сравнению с мышами дикого типа, инъектированных ФСБ (wt ФБС, n=31).
 20 Мыши, трансгенные по hIAPP, после обработки ФСБ показали ослабление в
 увеличении массы тела по сравнению с мышами дикого типа. tg NI-203.26C11-
 ch по сравнению с tg PBS: * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$; tg ФСБ по сравнению с wt
 ФСБ: # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$; tg NI-203.26C11-ch по сравнению с wt ФСБ: §
 25 $p < 0.05$.

30 **Фиг. 9:** NI-203.26C11 преимущественно распознает ранние виды фибриллярных
 агрегатов hIAPP. (А) Анализ агрегации Тиофлавина-Т (Тио-Т) с классической
 сигмоидальной кривой агрегации для hIAPP (■), но не для агрегации IAPP
 грызунов (□; rIAPP). (Б) Анализ образцов DotBlot (1:3 серия разбавления),
 30 взятых из эксперимента с Тио-Т во временных точках, показывающих
 обнаруженное неселективное связывание антитела против hIAPP во всех
 собранных образцах hIAPP, а также в образце rIAPP, взятого через 20 мин. В
 противоположность, NI-203.26C11 продемонстрировал селективное связывание
 в препаратах hIAPP, взятых в ростовой фазе агрегации hIAPP (5'), с пониженным

связыванием к образцам hIAPP, взятых в поздние временные точки (10' и 20'). Важно, NI-203.26C11 оставался иммунно-отрицательным для неагрегированных фракций hIAPP (0') и не взаимодействовал с rIAPP. В анализе с задерживающим фильтром (FRA), антитело против IAPP распознавало СДС-устойчивые виды фибриллярные виды hIAPP во всех проанализированных временных точках, где не было видно реактивности NI-203.26C11 против этих видов hIAPP. (B) Анализ с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) образцов, взятых из анализа агрегации Thio-T, выявил разнообразный морфологический спектр. Огромные фибриллярные агрегаты hIAPP не могли быть обнаружены ни на взятом перед агрегацией (0') образце, ни на образце rIAPP, взятом на поздней стадии (20'). Промежуточные виды hIAPP показали как аморфные нефибриллярные, так и фибриллярные характеристики (5'), в то время как образцы, взятые на границе (10') или в пределах равновесной фазы (20'), преимущественно показали фибриллярную морфологию.

Фиг. 10: Антитело NI-203.26C11 нормализует толерантность к глюкозе у трансгенной модели на крысах с диабетом 2 типа (крысы, трансгенные по hIAPP). Рекомбинантное химерное антитело крысы NI-203.26C11 вводили раз в неделю крысам, трансгенным по hIAPP (tg NI-203.26C11-r, n=9; 3 мг/кг в.б.), и крысам дикого типа (wt NI-203.26C11-r, n=4; 3 мг/кг в.б.). ФСБ использовали как плацебо у крыс, трансгенных по hIAPP (tg ФСБ, n=10), и крыс дикого типа (wt ФСБ, n=5). (A) Пероральный глюкозотолерантный тест (oGTT) перед лечением у 3-месячных крыс, трансгенных по hIAPP, и у крыс дикого типа, показывающий эквивалентные уровни глюкозы в крови. (B) NI-203.26C11-r антитело нормализует уровни глюкозы в крови у крыс, трансгенных по hIAPP, в процессе перорального глюкозотолерантного теста (oGTT) через 8 недель лечения по сравнению с крысами tg ФСБ и wt ФСБ. NI-203.26C11-r антитело не влияет на уровни глюкозы в крови у крыс дикого типа (wt NI-203.26C11-r). tg NI-203.26C11-r по сравнению с tg ФСБ: ** $p < 0.01$.

ПРИМЕРЫ

Способы

Антитело

Антитела человеческого происхождения, связывающие агрегированные виды IAPP человека (hIAPP) идентифицировали с помощью высоко-производительных анализов всех комплементов В-клеточного репертуара памяти человека, полученных от клинически отобранных популяций пожилых людей. Антитела против кДНК, полученные от hIAPP-реактивных В-клеток памяти, были экспрессированы для определения связывающих свойств. Чтобы избежать нейтрализации ответов антител мыши и крысы, направленных на антитело человека, направленных против IgG человека, с помощью белковой инженерии были получены химерные антитела, включающие переменные домены человека и константные участки мыши или крысы. hIAPP-реактивные клоны IgG рекомбинантно получали в CHO, чтобы определить характеристики *in vitro* и подтвердить исследования *in vivo* на трансгенных мышах и крысах. Выход белка был доведен до 20 литров в волновых реакторах для обеспечения получения антител в количестве 100 мг. Антитела были очищены от эндотоксина с помощью аффинной хроматографии.

Мыши

Мыши были получены в Лаборатории Джексона (Bar Harbor, ME). Гемизиготные самцы трансгенных мышей (F1) с экспрессией hIAP в островковых β -клетках, приводимой промотором инсулина II крысы, и были получены самцы мышей дикого типа (F1) с генетическим фоном FVB/N \times DBA/2J путем скрещивания трансгенных по hIAPP самцов с генетическим фоном FVB/N (FVB/N-Tg(Ins2-IAPP)RHFSoel/J) с самками мышей дикого типа с генетическим фоном DBA/2J. Трансгенный статус определялся с помощью ПЦР геномной ДНК, используя олигонуклеотидные праймеры к hIAPP- трансгену.

Мыши показали раннее начало метаболического фенотипа, т.е. спонтанно развивающийся диабет у мышей, характеризующийся нарушением толерантности к глюкозе и гипергликемией, уже присутствует в возрасте одного и двух месяцев, соответственно. Описанные ранее модели на мышах спонтанно не развивают диабет и спонтанно развивают диабет с гипергликемией и нарушением толерантности к глюкозе в возрасте от 6 до 10 месяцев, см., например, Couce *et al.* Diabetes 45 (1996), 1094-1101; Soeller *et al.* Diabetes 47 (1998), 743-750; Hull *et al.* Diabetes 52(2) (2003), 372-379; Hull *et*

al. Am J Physiol Endocrinol Metab 289 (2005), 703-709; Butler *et al. Diabetes* 52 (2003), 2304-2314; Hoppener *et al. Diabetologia* 42(4) (1999), 427-434; and Janson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(14) (1996), 7283-7288; по сравнению с описанной в данной заявке моделью на мышах. Кроме того, модель на мышах согласно настоящему изобретению показала

5 появление внеклеточных амилоидных отложений в возрасте двух месяцев и обширный амилоидоз, наблюдаемый в возрасте 4 месяцев, с сопутствующей потерей β -клеток по сравнению с ранее описанными моделями на мышах, где минимальное амилоидное отложение наблюдалось у мышей, спонтанно развивающих диабет, а также, показала

10 внеклеточное амилоидное отложение в возрасте 12 месяцев (амилоидная тяжесть = от 1 до 5% и амилоидная превалентность = от 40 до 60%), с попутной потерей β -клеток, и показала внеклеточное амилоидное отложение в возрасте от 16 до 19 месяцев (амилоидная превалентность = от 25 до 85%), с сопутствующей потерей β -клеток; см., например, Hull *et al. Diabetes* 52(2) (2003), 372-379; Hull *et al. Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 (2005), 703-709; Hoppener *et al. Diabetologia* 42(4) (1999), 427-434.

15

Новые свойства модели на мышах в отношении предыдущих моделей (см. обзор: Matveyenko *et al. (2006), ILAR J.* 47(3): 225-233) включают:

1) Различный генетический фон:

- Наша модель на мышах: гемизиготные по hIAPP трансгены с генетическим
- 20 фоном FVB/N \times DBA/2J.
- Ранее описанные модели на мышах: гемизиготные по hIAPP трансгены с генетическим фоном FVB/N (Couce *et al. (1996), Diabetes* 45: 1094-1101), FVB/N/A^{vy}/A (Soeller *et al. (1998), Diabetes* 47: 743-750), C57BL/6J (Hull *et al. (2005), Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709), DBA/2J (Hull *et al. (2005), Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709), C57BL/6J \times DBA/2J (Hull *et al. (2003), Diabetes* 52(2): 372-379; Hull *et al. (2005), Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709), C57BL/6J/A^{vy}/A (Butler *et al. (2003), Diabetes* 52: 2304-2314), and ob/ob (Hoppener *et al. (1999), Diabetologia* 42(4): 427-434) background. Homozygous hIAPP transgenics under a FVB/N background (Janson *et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(14): 7283-7288).
- 30

2) Ранний метаболический фенотип:

- Наша модель на мышах: мыши спонтанно развивают диабет, характеризующийся нарушением толерантности к глюкозе и гипергликемией, уже в возрасте одного и двух месяцев, соответственно.

5 - Ранее описанные модели на мышах:

○ Мыши спонтанно не развивают диабет: гемизиготные по hIAPP трансгены с генетическим фоном FVB/N (Couce *et al.* (1996), *Diabetes* 45: 1094-1101), C57BL/6J (Hull *et al.* (2005), *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709), и генетическим фоном DBA/2J (Hull *et al.* (2005), *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709).

10

○ Мыши спонтанно развивают диабет с гипергликемией и нарушением толерантности к глюкозе в возрасте от 6 до 10 месяцев: гемизиготы по hIAPP трансгены с генетическим фоном FVB/N/A^{vy}/A (Soeller *et al.* (1998), *Diabetes* 47: 743-750), C57BL/6J/A^{vy}/A (Butler *et al.* (2003), *Diabetes* 52: 2304-2314), C57BL/6JxDBA/2J (Hull *et al.* (2003), *Diabetes* 52(2): 372-379; Hull *et al.* (2005), *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709) и генетическим фоном ob/ob (Hoppener *et al.* (1999), *Diabetologia* 42(4): 427-434).

15

20 3) Ранняя и более выраженная патология островков:

- Наша модель на мышах: появление внеклеточных амилоидных отложений в возрасте двух месяцев и обширный амилоидоз, наблюдаемый в возрасте 4 месяцев с сопутствующей потерей β -клеток.

- Ранее описанные модели на мышах: минимальное амилоидное отложение у мышей, спонтанно развивающих диабет. Гемизиготные по hIAPP трансгены с генетическим фоном C57BL/6JxDBA/2J (Hull *et al.* (2003), *Diabetes* 52(2): 372-379; Hull *et al.* (2005), *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 703-709) показали внеклеточное амилоидное отложение в возрасте 12 месяцев (амилоидная тяжесть = от 1 до 5% и амилоидная превалентность = от 40 до 60%) с сопутствующей потерей β -клеток. Гемизиготные по hIAPP трансгены с генетическим фоном ob/ob (Hoppener *et al.* (1999), *Diabetologia* 42(4): 427-434) показали внеклеточное амилоидное отложение в возрасте от 16 до 19 месяцев (амилоидная превалентность = от 25 до 85%) с сопутствующей потерей β -клеток.

25

30

Мышей содержали в условиях 12 часового светового графика и держали на стандартной диете, включающей (как процент от общего числа калорий [ккал]) 7% жира и 18% белка (KLIVA NAFAG). Все мыши имели свободный доступ к пище и воде.

5

Крысы

Гемизиготные трансгенные крысы с экспрессией hIAPP в островковых β -клетках запускались промотором инсулина II крысы (Matveyenko *et al.*, Diabetes (2009), 1604-1615; Butler *et al.*, Diabetes (2004), 1509-1516), и крысы дикого типа линии Спрег-Доули были получены из Лабораторий Чарльза Ривера (Германия). Крыс содержали в условиях 12 часового светового графика и держали на стандартной диете. Все крысы имели свободный доступ к пище и воде.

Лечение

15 Трансгенным мышам вводили 1 раз в неделю рекомбинантное химерное антитело мыши NI-203.26C11-ch (10 мг/кг массы тела; в.б.), начиная с возраста 4 недели и на протяжении всего исследования. Трансгенным мышам, обработанным растворителем, и мышам дикого типа внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (ФСБ). Трансгенным мышам и мышам дикого типа вводили один раз в неделю рекомбинантное химерное по 20 IgG2b антитело крысы NI-203.26C11-r (3 мг/кг массы тела; в.б.), начиная с возраста 12 недель и на протяжении всего исследования. Трансгенным крысам, контрольных для растворителя, и крысам дикого типа внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (ФСБ).

25 Пероральный глюкозотолерантный тест, уровень глюкозы в крови натощак, инсулин в плазме и hIAPP в плазме

Для глюкозотолерантного теста мышам через 5 часов голодания и всю ночь голодавшим крысам был перорально введен раствор глюкозы 2 г/кг. Образцы крови брали из хвостовой вены мыши до и через 10, 30, 60, 120 и 240 мин после инъекции глюкозы. 30 Кровь крысы собирали из подъязычной вены и под газовой анестезией до и через 30, 60, 120 и 240 мин после инъекции глюкозы. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра (CONTOUR XT сенсоры, Bayer). Уровень глюкозы в крови натощак измеряли в образцах крови, взятой после ночного голодания. Концентрацию инсулина в

плазме натощак и уровни hIAPP измеряли с помощью набора для иммуноферментного анализа (ELISA) инсулина мыши (Merckodia) и амилина человека (Millipore).

Гистология

5 Мышей умерщвляли, и поджелудочные железы препарировали, взвешивали (для расчета массы поджелудочной железы), фиксировали в 4% (масс./об.) параформальдегиде в фосфатном буфере, заливали в парафин и делали 3-мкм срезы. Парафиновые ткани человека получали из Университетской клиники Базеля (УНВ, Базель, Швейцария) и делали 3-мкм срезы. Срезы окрашивали 0.1% (масс./об.) тиофлавином S для
10 визуализации амилоидных отложений, поликлональным антителом морской свинки против инсулина (1:3; FLEX; Dako), моноклональным антителом мыши против IAPP (1:100; R10/99; Abcam), поликлональным антителом крысы против глюкагона, и рекомбинантным антителом NI-203.26C11 (химерное человека или мыши). После обработки первичным антителом срезы инкубировали с TRITC-конъюгированным
15 антителом осла против морской свинки (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK), Cy5-конъюгированное или биотинилированное антитело осла против мыши, Cy5-конъюгированное антитело козы против крысы, Cy5-конъюгированное или биотинилированное антитело осла против человека. Стрептавидин-биотин пероксидазную реакцию (Vectastain ABC kit, Vector Lab Inc., Бурлингем, США)
20 использовали с биотинилированными вторичными антителами и срезы контрастировали гематоксилином для визуализации клеточных ядер. Анализ изображений выполняли с помощью Image J software. Для подсчета ТiоS-положительной амилоидной области, инсулин-положительной области, средней площади островка и плотности островка, все островки на срезе поджелудочной железы (пять срезов на животное) подробно
25 исследовались при 20x увеличении. ТiоS-положительная амилоидная область и инсулин-положительная область были определены как области, соответствующие флуоресценции выше заданного порогового значения. Островковую область определяли вручную, очерчивая островок, визуализируемый на канале ТiоS, где контур островка хорошо виден. Окрашивание ТiоS было выражено по отношению к области
30 поджелудочной железы и инсулиновой зоны. Окрашивание инсулина было выражено по отношению к области поджелудочной железы и зоны островка.

Статистический анализ

Данные выражали в виде средних значений \pm SEM. Достоверные отличия между парами групп определяли с помощью критерия Стьюдента. Данные толерантности глюкозы анализировали с помощью повторных измерений ANOVA (время исследования и лечения как независимые переменные). Все статистические анализы проводились с использованием Prism software (GraphPad Software Inc., Сан Диего, CA, США). $p < 0.05$ считалось значимым.

Пример 1: Проверка афинности и селективности антител к патологическому hIAPP в ткани человека

Чтобы протестировать, узнает ли селективно и дозо-зависимо антитело NI-203.26C11 патологические агрегаты hIAPP в ткани человека, т.е. в поджелудочной железе больных, имеющих сахарный диабет 2 типа (T2D), залитые в парафин срезы поджелудочной железы пациентов, имеющих диагностируемый T2D, показывающие амилоидную нагрузку в панкреатических островках, наблюдаемую при окрашивании ТиоS (субъект 1 и 2), исследовали для связывания антитела NI-203.26C11. В качестве контроля использовали парафиновые срезы поджелудочной железы пациентов, у которых не диагностировали T2D (субъект 3 и 4) (Фиг. 2).

После предварительной обработки муравьиной кислотой срезы инкубировали с антителом NI-203.26C11-ch в различных концентрациях, т.е. 1 нМ, 3 нМ, 10 нМ, и 30 нМ, или моноклональное антитело мыши против IAPP (1:100; Abcam, Кембридж, Великобритания) и вторичное антитело осла против мыши использовали как контроль с последующей инкубацией с биотинилированным вторичным антителом осла против человека (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания) или биотинилированным вторичным антителом козы против мыши (1:500; Jackson ImmunoResearch, Ньюмаркет, Великобритания). Сигнал с антитела амплифицировали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и детектировали с помощью диаминобензидинового (Thermo Fisher Scientific, США). После авидин/биотиновой блокировки (авидин/биотин блокирующий, Vector Laboratories, США) островковые β -клетки поджелудочной железы визуализировали, используя поликлональное антитело морской свинки против инсулина (1:5; Dako, США), связанного с биотинилированным вторичным антителом осла против морской свинки (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) и сигнал с антитела

амплифицировали с помощью набора Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, США) и детектировали с помощью субстрата для щелочной фосфатазы (Vector Laboratories, США).

- 5 Антитело NI-203.26C11 показало дозо-зависимое окрашивание в островках поджелудочной железы при наличии T2D, заполненных островковыми амилоидами (субъект 1 и 2), но не в островках поджелудочной железы контрольного образца здорового субъекта, лишенных островковых амилоидов (субъекты 3 и 4) (Фиг. 2). Однако, антитело NI-203.26C11 не распознавало физиологический hIAPP в островках
- 10 поджелудочной железы контрольного образца здорового субъекта, как показаны на Фиг. 2 два нижних ряда.

- Кроме того, селективность антитела NI-203.26C11 тестировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания (Фиг. 3). Тканевые срезы метили антителом NI-
- 15 203.26C11 против IAPP и островковых β -клеток поджелудочной железы, моноклональное антитело мыши против IAPP человека (1:100; Abcam, Кембридж, Великобритания) и вторичное антитело осла против мыши, и поликлональное антитело морской свинки против инсулина (1:5; Dako, США) использовали для островковых β -клеток поджелудочной железы. Визуализацию выполняли с помощью флуоресцентно-
- 20 меченых вторичных антител.

- Коротко, залитые в парафин срезы метили с помощью NI-203.26C11 или с помощью моноклонального антитела мыши к IAPP (1:100; Abcam, Кембридж, Великобритания) и далее с помощью Cy5-меченого вторичного антитела IgG осла против антитела мыши.
- 25 Островковые β -клетки поджелудочной железы, т.е. инсулин, совместную локализацию с IAPP определяли с помощью поликлонального антитела морской свинки к инсулину (1:5; Dako, США), связанного с TRITC-меченым вторичным антителом осла против антитела морской свинки (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). Окрашенные образцы покрывали покровным стеклом в Трис-буферном растворе
- 30 глицерола (3:7 смесь 0.1 М Tris-HCl при pH 9.5 и глицерола с добавлением 50 мг/мл n-пропилгаллата).

В результате, рекомбинантное химерное антитело мыши NI-203.26C11 (NI-203.26C11-ch; голубой; 100 нМ; Фиг. 3 верхние панели) детектировали агрегаты hIAPP в островках

поджелудочной железы при наличии T2D. В частности, окрашивание ограничивало островковые области, лишенные β -клеток (не совмещенное окрашивание инсулина красным). Однако не наблюдалось окрашивания физиологического IAPP в здоровых контрольных островках поджелудочной железы, лишенных патологических агрегатов hIAPP.

Пример 2: Нарушение толерантности глюкозы предшествует отложению ТiоS-положительного материала у трансгенной модели на мышах с сахарным диабетом 2 типа

Чтобы протестировать отложение островковых амилоидов у трансгенной модели на мышах, островковые амилоиды визуализировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, описанного выше с использованием трансгенного hIAPP, и островки поджелудочной железы мыши дикого типа, окрашенные для визуализации островковых амилоидов (0.1% ТiоS), инсулина (антитело к инсулину; 1:3; красный) и глюкагона (антитело к глюкагону; 1:2500; голубой), в возрасте 14 недель, но не в 4 недельном возрасте, у трансгенных мышей, см. Фиг. 4. Как показано на Фиг. 4 (А) мыши дикого типа не имели островковых амилоидов по сравнению с трансгенными мышами.

Кроме того толерантность глюкозы измеряли у трансгенных мышей, см. Фиг. 4 (Б). Коротко, глюкозу вводили внутривенно животному через 5 часов голодания в дозе 2 мг на грамм массы тела, и далее уровень глюкозы в крови (периферическая кровь, концентрация глюкозы в крови) животного определяли каждые 15 мин на протяжении 240 минут с помощью коммерческого измерительного прибора (Medisafe Reader, Terumo Co., Ltd.). Измерение с использованием коммерческого измерительного прибора основано на колориметрическом анализе. Измерительный чип предварительно подготовлен, и на чип помещаются в качестве катализаторов глюкозооксидаза и пероксидаза, и в качестве хромогенных агентов 4-аминоантипирин и N-этил-N(2-гидрокси-3-сульфопропил)-m-толуидин. Когда образец крови абсорбируется при помощи капиллярного явления, он помещается на чип, здесь 4 мкл, и затем глюкоза в крови окисляется глюкозооксидазой. Далее, хромогенные агенты на чипе окисляются под действием пероксида водорода, образовавшегося в этот момент, и пероксидазы, которая дает красно-фиолетовый цвет. Количество глюкозы в крови подсчитано путем измерения степени этого цветового тона. Глюкозотолерантный пероральный тест выполняли у трансгенных и дикого типа мышей в возрасте 4 недель (верхняя панель) и

14 недель (нижняя панель), см. Фиг. 4 (Б). Результаты показали, что уровни глюкозы в крови после перорального введения глюкозы были выше у мышей, трансгенных по hIAPP, по сравнению с мышами дикого типа в возрасте 4 недель (tg, n=13; wt, n=9) и 14-недельном возрасте (tg, n=27; wt, n=31). Кроме того, уровни глюкозы в крови натощак были сходны среди групп в возрасте 4 недель, но были увеличены у мышей, трансгенных по hIAPP, в возрасте 14 недель.

Пример 3: Проверка аффинности и селективности антител к агрегатам hIAPP у мышей, трансгенных по hIAPP

Чтобы проверить аффинность и селективность антитела NI-203.26C11 к агрегатам hIAPP у мышей, трансгенных по hIAPP, выполняли иммунофлуоресцентный и иммуногистохимический анализы с помощью рекомбинантного антитела человека NI-203.26C11 (NI-203.26C11; голубой; 100 нМ), чтобы обнаружить агрегаты hIAPP в трансгенных островках, и антитела к инсулину (1:3; красный) для обнаружения инсулина в островковых β -клетках, см. Фиг. 5. Результаты выявили окрашивание с помощью NI-203.26C11 в островках поджелудочной железы трансгенных по hIAPP мышей в возрасте 4 и 16 недель (голубое окрашивание; левые панели, фиг. 5), без окрашивания у мышей дикого типа соответствующих возрастов (отсутствие голубого окрашивания; правые панели, Фиг. 5).

Дополнительно, антитело NI-203.26C11 вводили мышам, трансгенным по hIAPP, в возрасте 16 недель и мышам дикого типа при однократном введении (10 мг/кг (внутрибрюшинно)) и оценивали его связывание на 2 день после введения с помощью вторичного антитела против человека, см. Фиг. 6.

Было показано, что рекомбинантное антитело человека NI-203.26C11 (коричневое окрашивание, Фиг. 6.) метит трансгенные островки, показывающие ТiоS-положительные амилоиды (зеленое окрашивание, Фиг. 6.), но не ТiоS-отрицательные островки дикого типа. Кроме того, не наблюдалось окрашивания с контрольными IgG.

Пример 4: Введение антител согласно настоящему изобретению предотвращает потерю β -клеток у мышей, трансгенных по hIAPP

Чтобы протестировать влияние NI-203.26C11 на β -клетки у мышей, трансгенных по hIAPP, измеряли инсулин поджелудочной железы, островковую область и секрецию инсулина после обработки однократным введением в неделю рекомбинантного

химерного антитела мыши NI-203.26C11 у мышей, трансгенных по hIAPP (tg NI-203.26C11-ch, n=23; 10 мг/кг, внутривенно, в течение 12 недель); см. Фиг. 7.

5 Коротко, парафиновые срезы метили поликлональным антителом морской свинки к инсулину (1:5; Dako, США), и далее использовали TRITC-меченое вторичное антитело
осла против морской свинки (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США).
Окрашенные образцы покрывали покровным стеклом в трис-буферном растворе
глицерола (3:7 смесь 0.1 М трис-HCl при pH 9.5 и глицерола с добавлением 50 мг/мл n-
пропилгаллата). Подсчет инсулин-положительной области по отношению к
10 поджелудочной железе и островковой области, среднее значение островковой зоны и
островковой плотности описаны в разделе способы.

Результаты показали, что инсулин поджелудочной железы (инсулин-положительная
область в % от панкреатической области и % от островковой области; верхняя левая и
15 верхняя средняя панели), островковая зона (соответствует островковой области; верхняя
правая панель) и секреция инсулина (уровни инсулина в плазме; нижняя левая панель)
были увеличены по сравнению с мышами, трансгенным по hIAPP, получавшим ФСБ (tg
ФСБ, n=28). Однако островковая плотность и панкреатическая масса были неизменны
после обработки с помощью NI-203.26C11-ch (нижняя средняя и нижняя правая панели,
20 соответственно, Фиг. 7).

Пример 5: Антитело согласно настоящему изобретению преимущественно распознает ранний фибриллярный IAPP

Чтобы протестировать, какой вид агрегатов IAPP связывает антитело NI-203.26C11,
25 выполнили анализ агрегации Тиофлавина-Т (Thio-T). Коротко, оценивали спонтанную
агрегацию синтетического hIAPP путем мониторинга образования амилоидных фибрилл
посредством увеличения флуоресценции амилоид-специфического красителя
Тиофлавина-Т (Тио-Т). Лиофилизированный синтетический пептид hIAPP (Bachem,
Швейцария) растворяли в чистом ДМСО и смешивали с раствором Тио-Т (20 мкМ Тио-
30 Т в 20 мМ трис-HCl, pH 8.5) до финальной концентрации пептида 20 мкМ. После
фильтрации через 0.22 мкм фильтр (Millipore), агрегированный раствор непосредственно
переносили в флуоресцентные кварцевые кюветы и регистрировали агрегацию при
перемешивании на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent),
измеряющего длину волны излученной флуоресценции при 489 нм (возбуждение при 456

nm) каждую минуту при комнатной температуре. Анализ показал классическую сигмоидальную кривую агрегации для hIAPP, но не для IAPP грызунов (rIAPP), как показано на Фиг. 9 А.

5 Дополнительно был выполнен анализ DotBlot на образцах из эксперимента с использованием Тио-Т. Анализ DotBlot проводили следующим образом, препараты hIAPP, взятые из анализа исследования агрегации, серийно разводили и фильтровали через предварительно уравновешенную с помощью ФСБ-Т (0.1% твин-20 в ФСБ) нитроцеллюлозную мембрану (размер поры 0.1 мкм). Лунки промывали PBS-Т и
10 добавляли образцы. После полной фильтрации мембрану промывали 3 раза. Затем мембрану вскоре высушивали в течение 15 мин при комнатной температуре, инкубировали в блокирующем буфере (3% БСА, 0.1% твин-20 в ФСБ) в течение 1 ч при комнатной температуре, и инкубировали с химерным антителом мыши NI-203.26C11 (5 мкг/мл в блокирующем буфере) в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве
15 контрольного антитела использовали антитело к IAPP курицы (1:1000; P10997, Agrisera). После промывки мембрану инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами курицы против человека и мыши (1:10000 разведение; Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 1 ч при комнатной температуре. Конверсию субстрата HRP (ECL) анализировали, используя детекцию ImageQuant LAS 4000 (GE
20 Healthcare). Как показано на Фиг.9 Б, можно обнаружить селективное связывание препаратов hIAPP на ранних фазах агрегации hIAPP, в то время как уменьшенное связывание наблюдали на поздних фазах роста. Однако антитело NI-203.26C11 оставалось иммунно-отрицательным для неагрегированных фракций hIAPP (0') и не взаимодействовало с rIAPP.

25 Кроме того, был выполнен анализ при помощи задерживающего фильтра (FRA), используя препарат hIAPP из анализа агрегации, смешанный с 2% СДС. Образцы затем фильтровали через мембрану из ацетата целлюлозы, и блокировали мембрану блокирующим буфером (3% молоко, 0.1% Твин-20 в ФСБ) в течение 1 ч при комнатной
30 температуре. Обнаружение устойчивых к СДС ассамблей hIAPP выполняли как описано для анализа DotBlot. Анализ FRA показал, что антитело к IAPP распознает СДС-устойчивые виды фибриллярного IAPP во всех проанализированных временных точках, где невозможно было наблюдать реакционную способность антитела NI-203.26C11 к этим видам hIAPP, см., например, Фиг. 9 Б.

Морфологию собраний hIAPP оценивали с помощью анализа на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЕМ). Коротко, образцы адсорбировали на тлеющих разрядных покрытых углеродом медных сетках, и избыток образца удаляли с помощью блоттинга на фильтровальной бумаге. Сетки окрашивали 2% (w/v) уранил ацетатом в течение 60 сек, и избыток раствора удаляли с помощью промывки бидистиллированной H₂O. После высыхания на воздухе сетки исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе Philips CM100 с ускоряющим напряжением 100 кВ. Как показано на Фиг.9 (В) разнообразный морфологический спектр можно оценить с помощью ТЕМ. В частности, в момент времени 0 мин, который указывает на момент времени до агрегации, нет больших фибриллярных агрегатов. Через 5 мин можно наблюдать аморфные, нефибриллярные, а также фибриллярные характеристики. Фибриллярную морфологию наблюдали в образцах, взятых в поздние временные точки, т.е. 10 мин и 20 мин.

Пример 6: Введение антител согласно настоящему изобретению предотвращает симптомы, связанные с диабетом

Чтобы доказать, может ли введение антитела NI-203.26C11 улучшать симптомы, связанные с диабетом, вводили рекомбинантное химерное антитело мыши NI-203.26C11 однократно в неделю мышам, трансгенным по hIAPP (tg NI-203.26C11-ch, n=24; 10 мг/кг внутривенно), и оценивали уровень глюкозы в крови, толерантность к глюкозе, массу тела, как это было уже описано выше; см. Фиг. 8.

Через 8 и 12 недель лечения антителом NI-203.26C11 показало значительное уменьшение уровня глюкозы в крови натощак, измеренного после ночного голодания, у мышей, трансгенных по hIAPP, по сравнению с группой ФСБ. Кроме того, через 10 недель лечения толерантность к глюкозе была значительно улучшена.

Более того, можно было наблюдать нормализацию веса тела, наблюдаемую у трансгенных по hIAPP мышей, обработанных антителом NI-203.26C11, т.е. прибавка массы тела была нормализована у мышей, трансгенных по hIAPP, обработанных антителом NI-203.26C11 в течение 12 недель лечения по сравнению с мышами дикого типа, которым вводили ФСБ (wt ФСБ, n=31). В частности, трансгенные по hIAPP мыши, обработанные ФСБ, показали нарушение в увеличении массы тела по сравнению с мышами дикого типа, см. Фиг. 8.

Таким образом, в результате было показано, что антитело NI-203.26C11 уменьшает уровень глюкозы в крови натощак, улучшает толерантность к глюкозе и нормализует увеличение массы тела у мышей, трансгенных по hIAPP.

5 Пример 7: Антитела согласно настоящему изобретению нормализуют толерантность к глюкозе у крысы, трансгенной по hIAPP

Кроме того, чтобы дополнительно улучшить результаты, полученные на трансгенных мышках, были исследованы эффекты антитела NI-203.26C11 на трансгенной модели крысы, имеющей диабет 2 типа (крысы, трансгенные по hIAPP), см. Фиг. 10. В частности, вводили рекомбинантное химерное антитело крысы NI-203.26C11-г, n=9; 3 мг/кг внутривенно и крысам дикого типа (wt NI-203.26C11-г, n=4; 3 мг/ кг внутривенно).

Чтобы проанализировать толерантность к глюкозе, перед лечением 3-месячных крыс, трансгенных по hIAPP, и крыс дикого типа выполнили пероральный глюкозотолерантный тест (oGTT), показавший эквивалентные уровни глюкозы в крови. В результате антитело NI-203.26C11-г нормализовало уровни глюкозы в крови у крыс, трансгенных по hIAPP, во время теста oGTT, проведенного после 8 недель лечения, по сравнению с крысами, трансгенными по hIAPP, обработанных ФСБ (tg ФСБ, n=10) и крысами дикого типа, обработанных ФСБ (wt ФСБ, n=5). Дополнительно было показано, что антитело NI-203.26C11-г не влияет на уровни глюкозы в крови у крыс дикого типа (wt NI-203.26C11-г).

SEQUENCE LISTING

<110> Neurimmune Holding AG
University of Zurich

<120> Новые соединения, способные противодействовать повреждению β -клеток, индуцируемому островковым амилоидным полипептидом, и нарушению толерантности к глюкозе

<130> NE30A48/P-WO

<150> EP14159194.1

<151> 2014-03-12

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<223> NI-203.26C11-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220>

<221> V_region

<222> (76)..(111)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> V_region

<222> (154)..(201)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220>

<221> V_region

<222> (298)..(330)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 1

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ttg gtg aag cct tct cag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc agt ggt 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

aat tac tac tgg acc tgg atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag 144
Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg att ggg cat atc tat tcc agt ggg acc acc aat tac aac ccc tcc 192
Trp Ile Gly His Ile Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

ctc gag agt cga gtc acc att tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240
Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

tcc ctg agc ctg aac tct gtg acc gcc gca gac acg gcc gtt tat tac 288
Ser Leu Ser Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcg aga cca ctg gct aca gtt ccg gat gct ttt aat atc tgg ggc 336
Cys Ala Arg Pro Leu Ala Thr Val Pro Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tcg 363
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Ser Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Pro Leu Ala Thr Val Pro Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)
<223> NI-203.26C11-VK variable kappa-light chain (VK) sequence

<220>
<221> V_region
<222> (70)..(114)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220>
<221> V_region
<222> (160)..(180)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220>
<221> V_region
<222> (277)..(303)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 3
gaa att gtg atg act cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gag agg gcc acc atc aag tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96
Glu Arg Ala Thr Ile Lys Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

aat aag aac ttc tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct 144
Asn Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa tta ctc att tac tgg gca tct act cgg gaa tcc ggg gtc cct gac 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag cag tat tat 288
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
85 90 95

agt aat cct aac act ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa 333
Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)
<223> NI-203.26C11-VK PIMC variable kappa-light chain (VK) sequence

<220>
<221> V_region
<222> (70)..(114)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220>
<221> V_region
<222> (160)..(180)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220>
<221> V_region
<222> (277)..(303)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 5
gat att gtg atg act caa tca cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gag agg gcc acc atc aag tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96
Glu Arg Ala Thr Ile Lys Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

aat aag aac ttc tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct 144
Asn Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa tta ctc att tac tgg gca tct act cgg gaa tcc ggg gtc cct gac 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag cag tat tat 288

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

agt aat cct aac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aag 333
Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> unique linear epitope recognized by antibody NI-203.26C11 aa 2 to
8

<400> 7

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула, связывающая островковый амилоидный полипептид человека (hIAPP), для применения для защиты β -клеток от индуцированного hIAPP повреждения, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или для восстановления нарушения толерантности к глюкозе, индуцируемого hIAPP, и/или для нормализации уровня глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом, при этом предпочтительно указанная молекула, связывающая hIAPP, селективно связывает агрегированный hIAPP в ткани поджелудочной железы субъекта, представляющего собой человека, имеющего диабет.
2. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с п.1, которую применяют для нормализации увеличения массы тела.
3. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с пп.1 или 2, при этом указанный субъект страдает от или подвержен риску развития сахарного диабета 2 типа (T2D) и/или гипертензии.
4. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с пп. 1-3, которая представляет собой антитело или фрагмент указанного антитела, связывающий hIAPP, предпочтительно отличающиеся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело человеческого происхождения или его синтетическое или биотехнологическое производное.
5. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с любым из пп. 1-4, при этом связывающий домен указанной молекулы содержит
 - (а) по меньшей мере участок, определяющий комплементарность (CDR) тяжелой цепи (VH), и/или аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (VL), согласно Фигуре 1 (SEQ ID NOs: 1; 3, 5);
 - (б) аминокислотную последовательность области VH и/или области VL, как представлено на Фигуре 1;
 - (в) по меньшей мере один CDR, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной путем частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей согласно (а); и/или

- (г) тяжелую цепь и/или легкий переменный участок, содержащий аминокислотную последовательность, полученной путем частичного изменения любой из аминокислотных последовательностей согласно (б).
6. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с любым из пп. 1-5, содержащая полипептидную последовательность, которая является гетерологичной по отношению к hIAPP-связывающему домену, например, области VH и/или VL и/или по меньшей мере одному CDR.
 7. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с любым из пп. 1-6, содержащая константный домен или его часть, которая гетерологична связывающему домену, например, области VH и/или VL и/или по меньшей мере одному CDR, при этом предпочтительно указанный константный домен представляет собой константный домен человека.
 8. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с п.7, отличающаяся тем, что указанный константный домен относится к типу IgG, предпочтительно к классу или изотипу IgG1.
 9. Молекула, связывающая hIAPP согласно любому из пп. 1-8.
 10. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно любому из пп. 1-9, которая (а) помечена поддающейся детектированию меткой, при этом предпочтительно указанная детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из фермента, радиоизотопа, флуорофора и тяжелого металла; или (б) присоединена к лекарственному средству.
 11. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно любому из пп. 1-10, которая представлена в форме фармацевтической композиции; необязательно дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, при этом предпочтительно, указанная молекула, связывающая hIAPP, предназначена для введения подкожно (п.к.), внутримышечно (в.м.), или внутривенно (в.в.); и/или еженедельно, раз в две недели или ежемесячно.

12. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно любому из пп. 1-11, которая предназначена для введения до или после появления островковых амилоидных фибрилл, протофибрилл, и/или амилоидных бляшек в ткани поджелудочной железы.
13. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно п. 12, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит агент, способный предотвращать или уменьшать образование амилоидного IAPP, при этом предпочтительно, указанный агент выбран из группы, состоящей из флавоноидов, аналогов IAPP, метформина и тиазолиндиндионов, таких как росиглитазон.
14. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно любому из пп. 1-13, которая является эффективной при введении в дозе приблизительно 10 мг/кг в модели на мышах, трансгенных по hIAPP, и/или приблизительно 3 мг/кг в модели, на животных, трансгенных по hIAPP.
15. Молекула, связывающая hIAPP, для применения согласно любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что указанное животное характеризуется способностью экспрессировать по меньшей мере один трансген, содержащий последовательность ДНК, кодирующую островковый амилоидный полипептид человека (hIAPP), и
 - (i) спонтанно развивающимся диабетом, характеризуемым нарушенной толерантностью к глюкозе и/или гипергликемией приблизительно в возрасте одного и двух месяцев, соответственно; и/или
 - (ii) появлением внеклеточных амилоидных отложений приблизительно в возрасте двух месяцев и/или обширным амилоидозом, связанным с потерей β -клеток в возрасте приблизительно 4 месяцев.
16. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с п. 15, отличающаяся тем, что указанное животное является гемизиготным и/или указанная последовательность ДНК функционально связана с промотором инсулина II крысы.
17. Молекула, связывающая hIAPP, для применения в соответствии с любым из пп. 14-16, отличающаяся тем, что указанным животным является крыса.

18. Способ защиты β -клеток от повреждения клеток, вызываемого hIAPP, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или восстановления нарушения толерантности к глюкозе, индуцируемого hIAPP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества молекулы, связывающей hIAPP, согласно любому из пп. 1-17.

19. Трансгенное животное, не являющееся человеком, согласно пп. 15 или 16, для применения при определении, способно ли исследуемое соединение защищать β -клетки от повреждения, вызываемого hIAPP, и/или от токсических эффектов островкового амилоида; и/или восстанавливать нарушение толерантности к глюкозе, индуцируемое hIAPP, также как молекула, связывающая hIAPP, согласно любому из пп. 1-14.

NI-203.26C11-VH (последовательность варибельной тяжелой цепи VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS GGSSISSGNYWTWIRQPAGKGLEWIGHIYSSGTTNYPNPSLES

FR3-----CDR3-----FR4-----
 RVTISVDTSKNQFSLSLNSVTAADTAVYYCAR PLATVPDAFNIWGQGMVTVSS

NI-203.26C11-VK (последовательность варибельной легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2----FR3-----
 EIVMTQSPDSLAVSLGERATIKC KSSQSVLYSNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS

-----CDR3-----FR4-----
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSNPNTFGQGTKVEIK

NI-203.26C11-PIMC-VK (последовательность варибельной легкой цепи VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2----FR3-----
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATIKC KSSQSVLYSNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS

-----CDR3-----FR4-----
 GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSNPNTFGQGTKLEIK

Сахарный диабет 2 типа

Здоровый контроль

ТiоS

NI-203.26C11-ch

Анти-IAPP

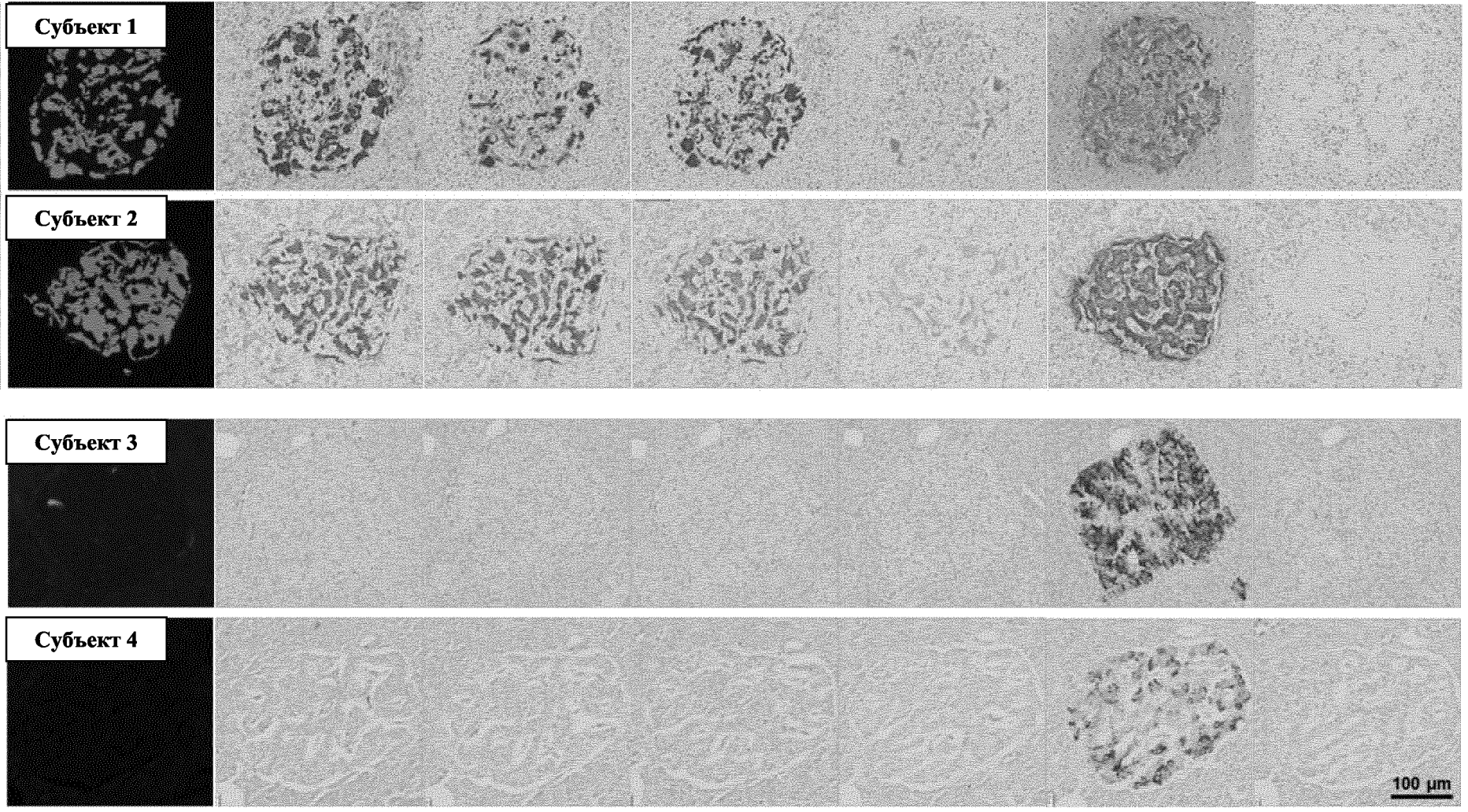
Вторичные анти-мышинные

30 нМ

10 нМ

3 нМ

1 нМ



Сахарный диабет 2 типа

Здоровый контроль

hIAPP

Инсулин

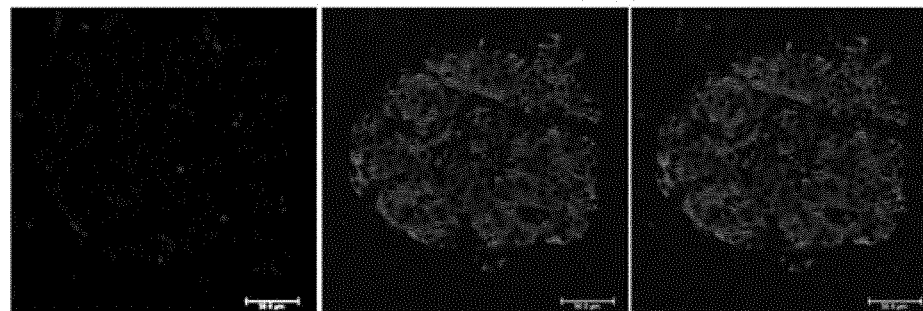
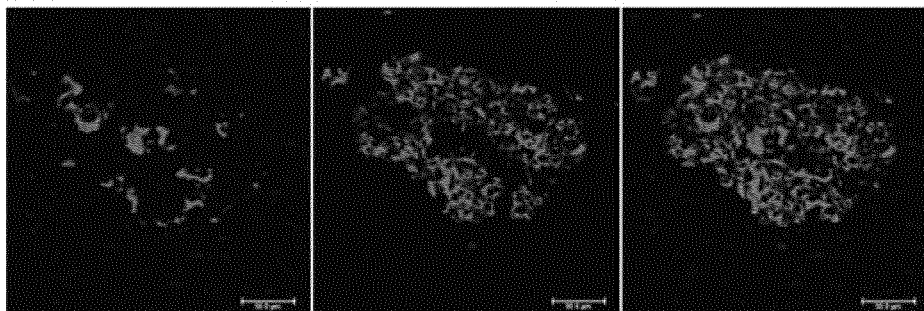
Совмещение

hIAPP

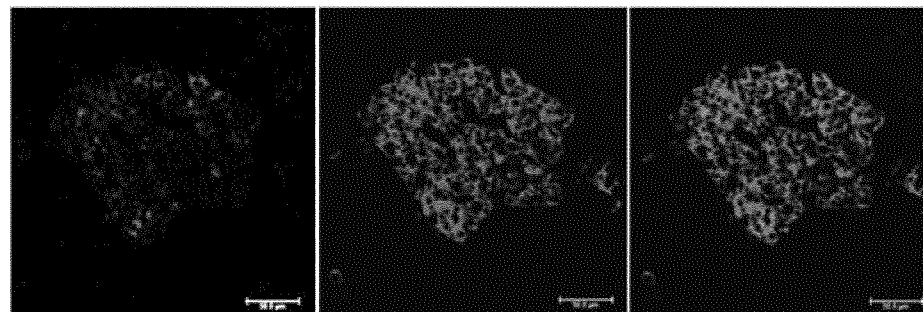
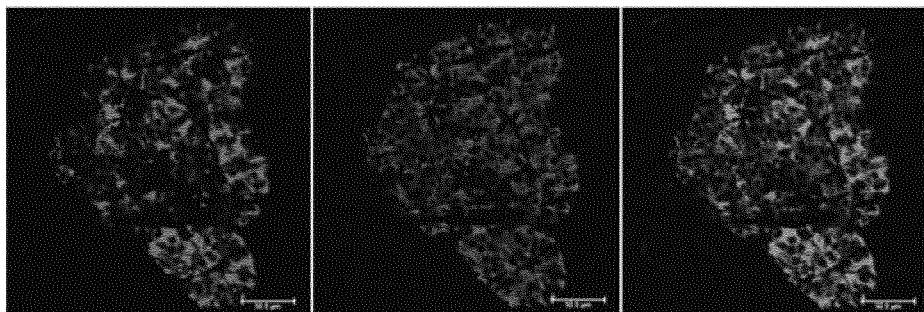
Инсулин

Совмещение

NI-203.26C11-ch



Анти-IAPP

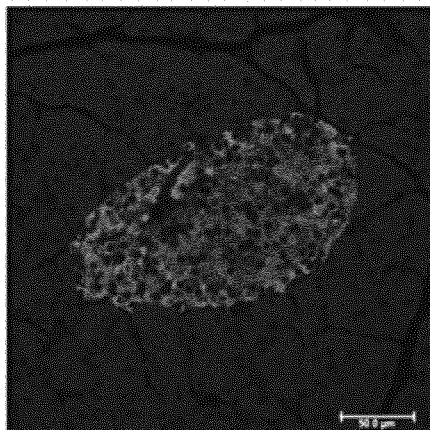
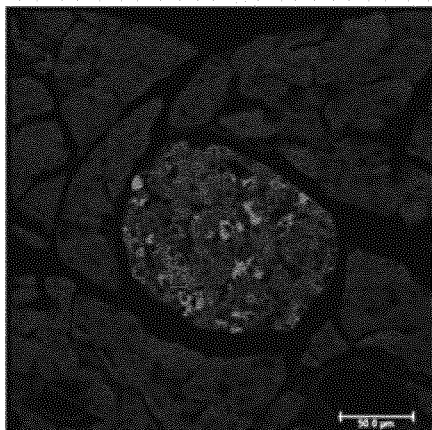


А

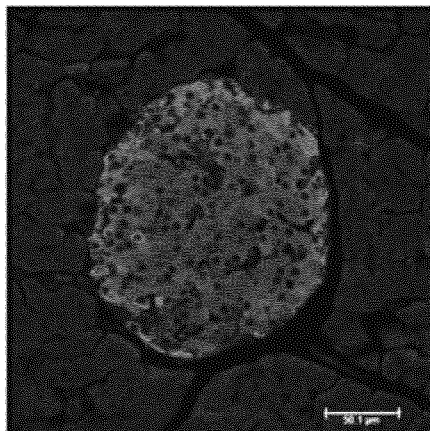
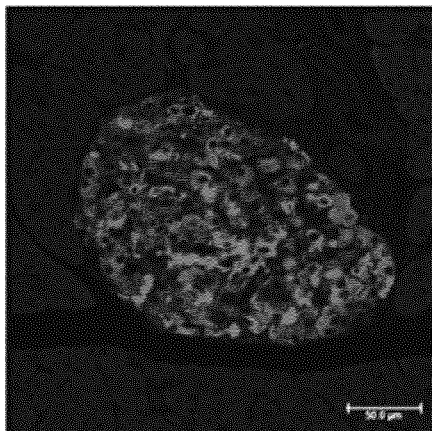
Трансгенные

Дикого типа

4 недели

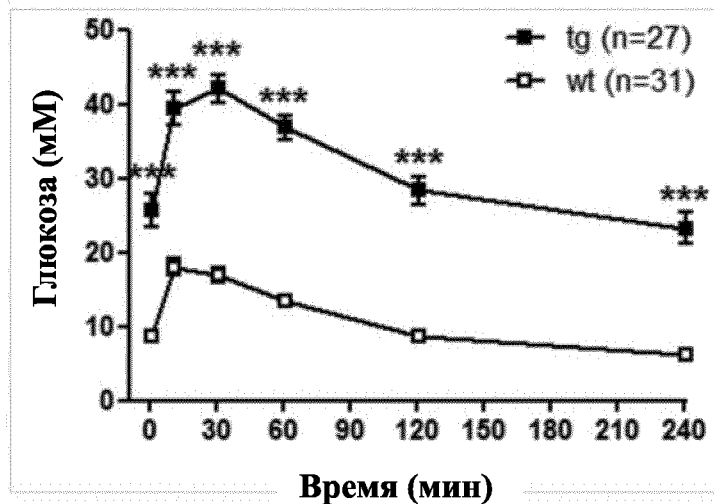
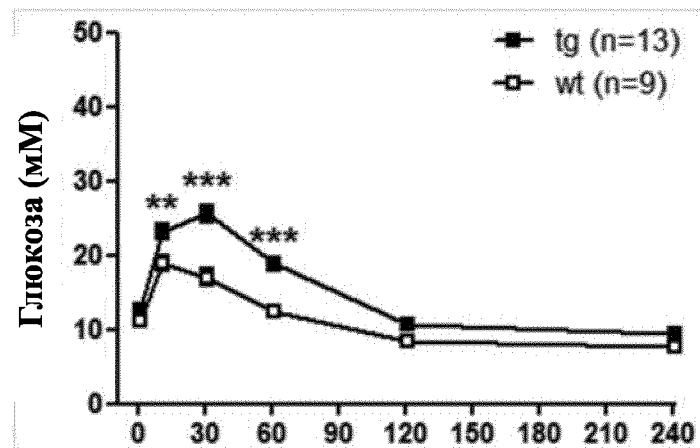


14 недель



Островковый амилоид
Инсулин
Глюкагон

Б



Трансгенные

Дикого типа

NI-203.26C11

Инсулин

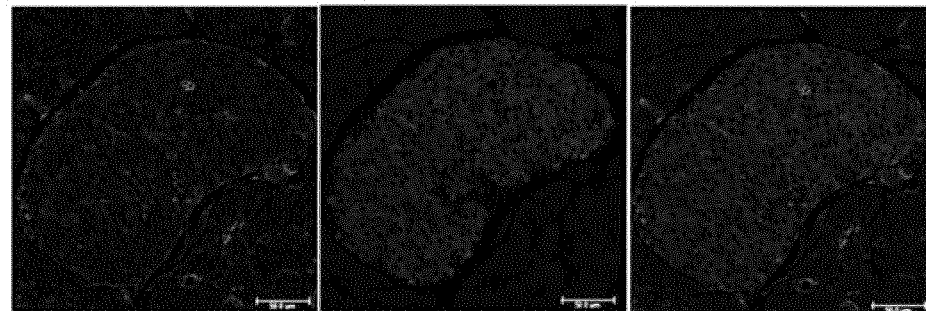
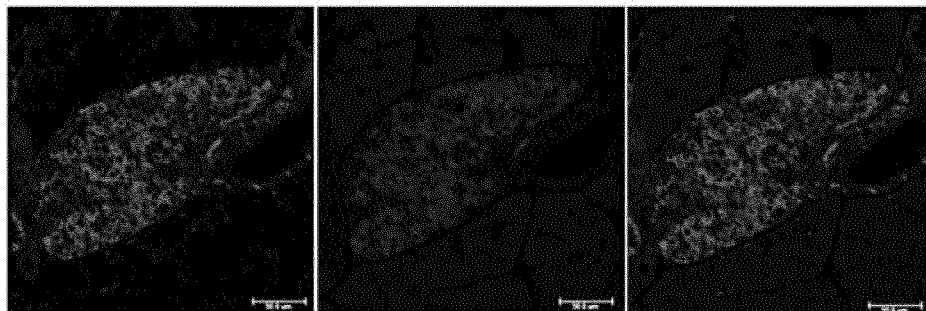
Совмещение

NI-203.26C11

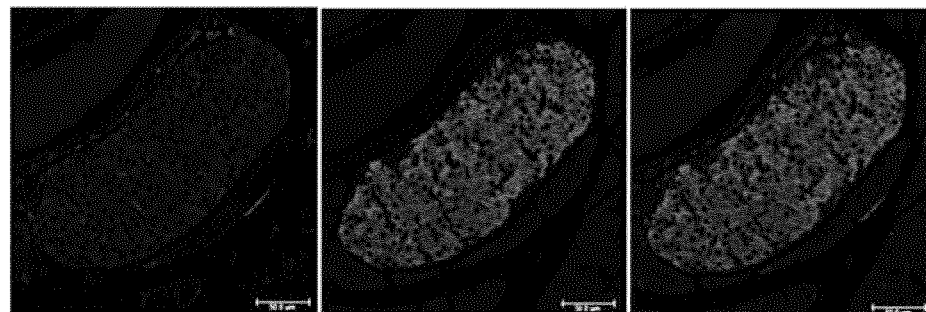
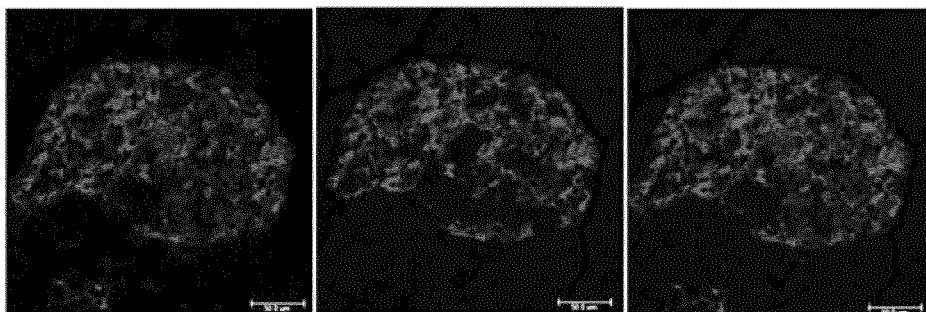
Инсулин

Совмещение

4 недели



16 недель



Трансгенные

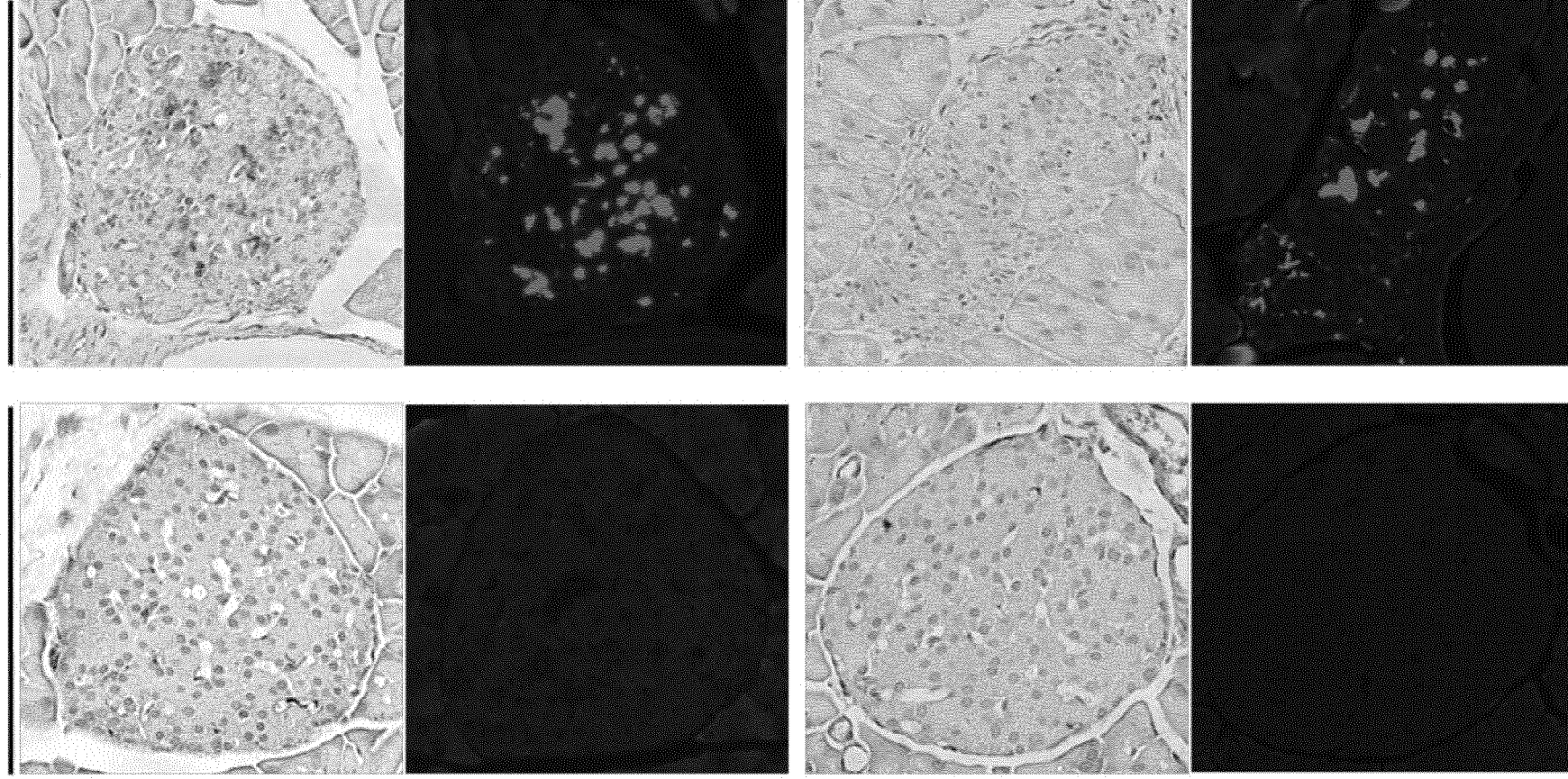
Дикого типа

NI-203.26C11

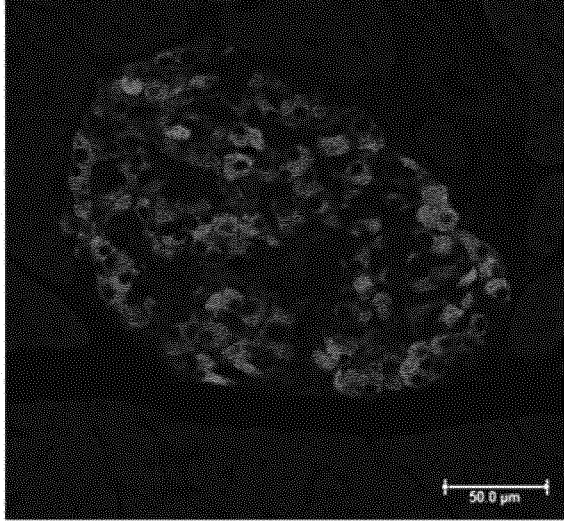
· ТiоS

Контрольные IgG

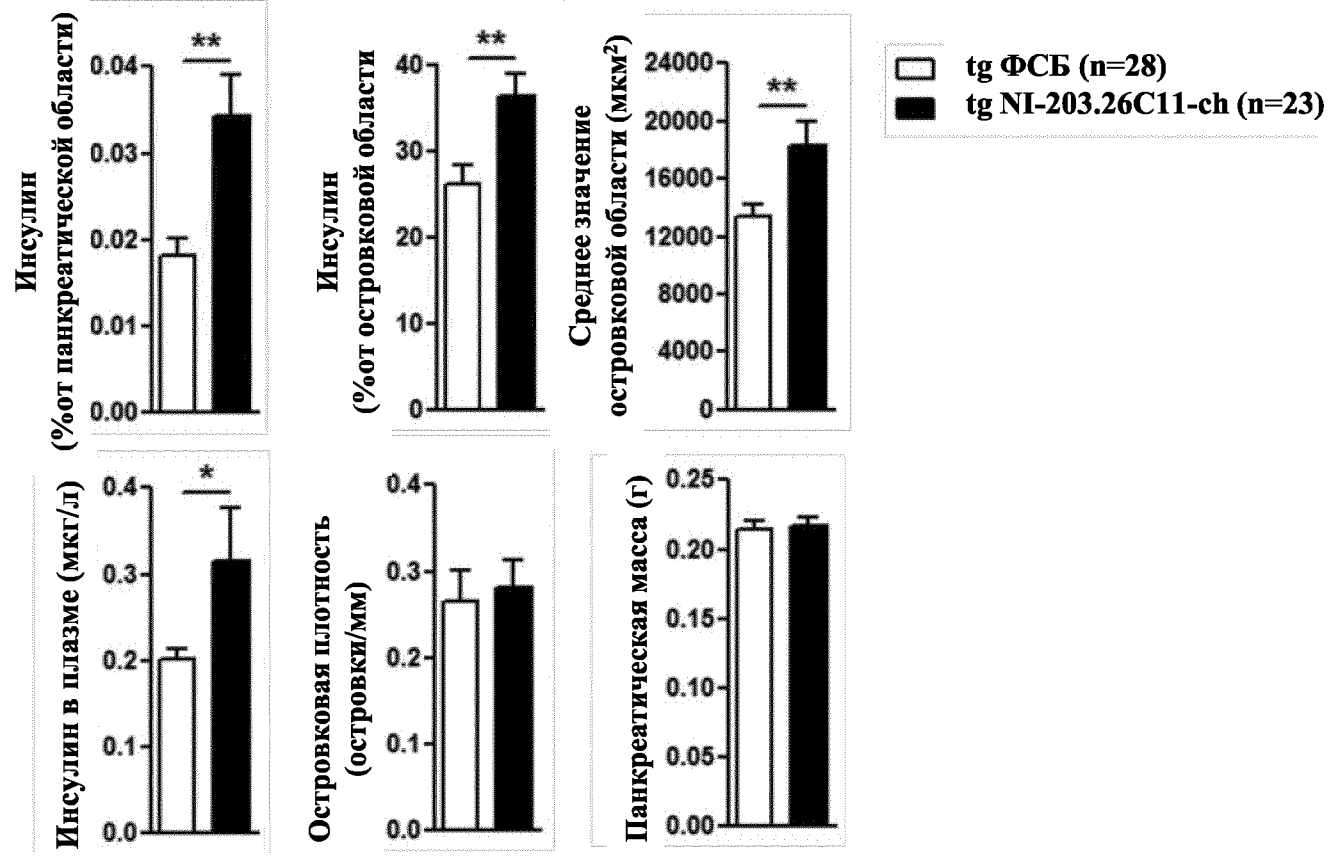
ТiоS

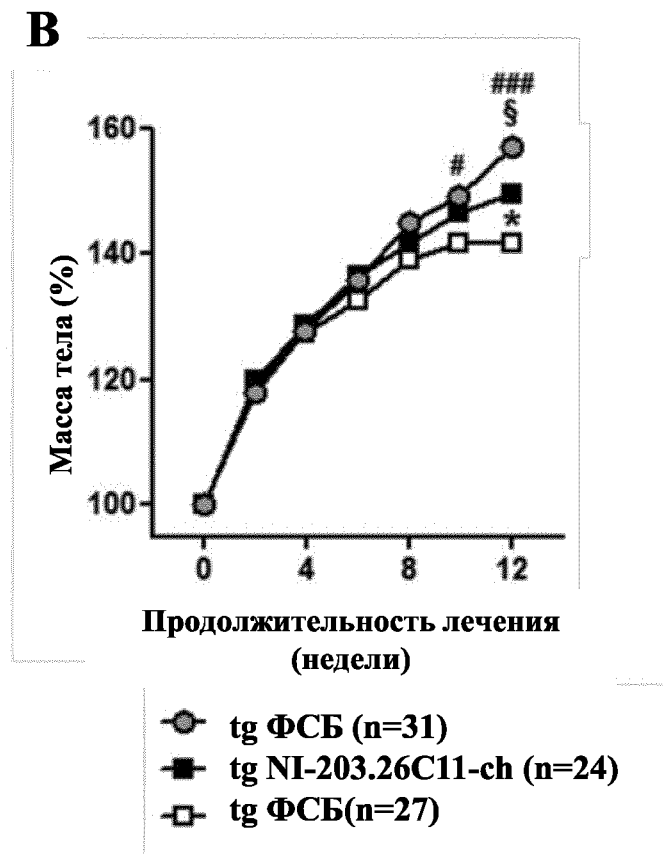
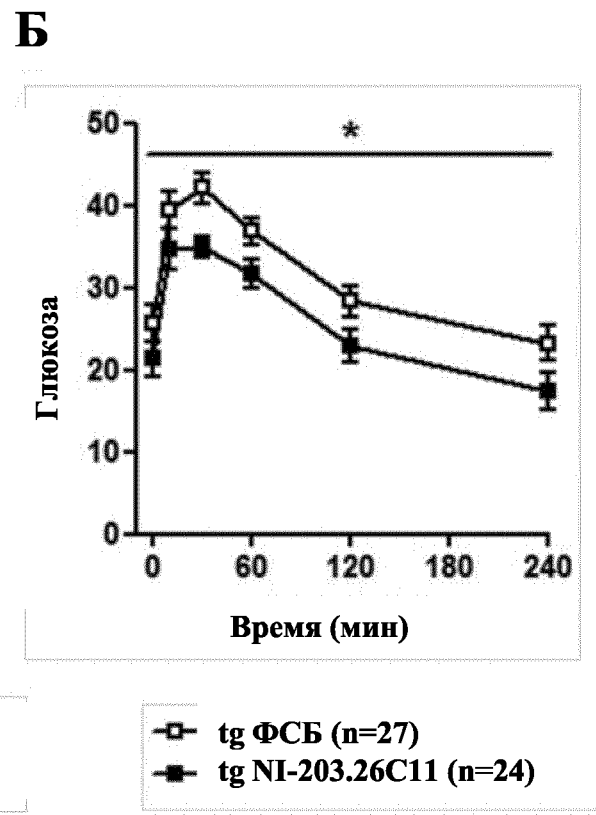
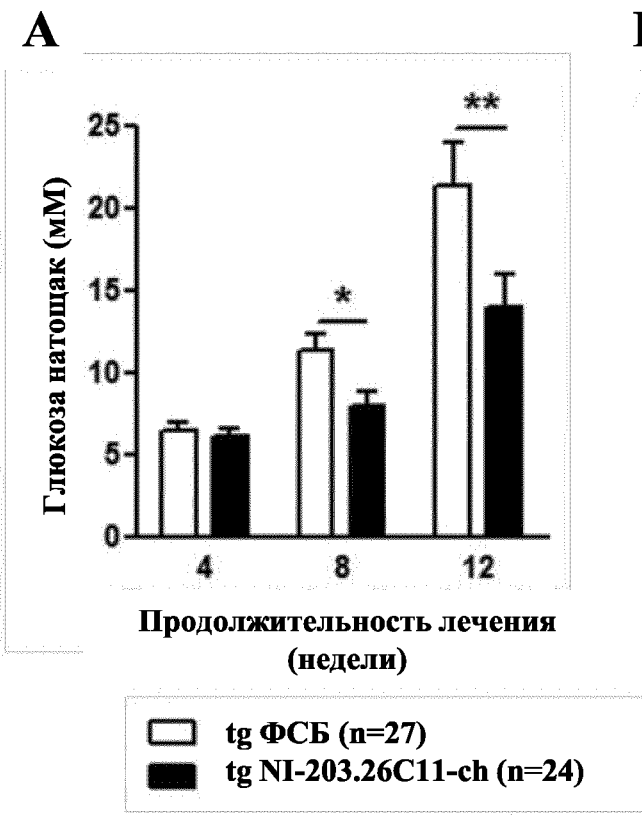


А

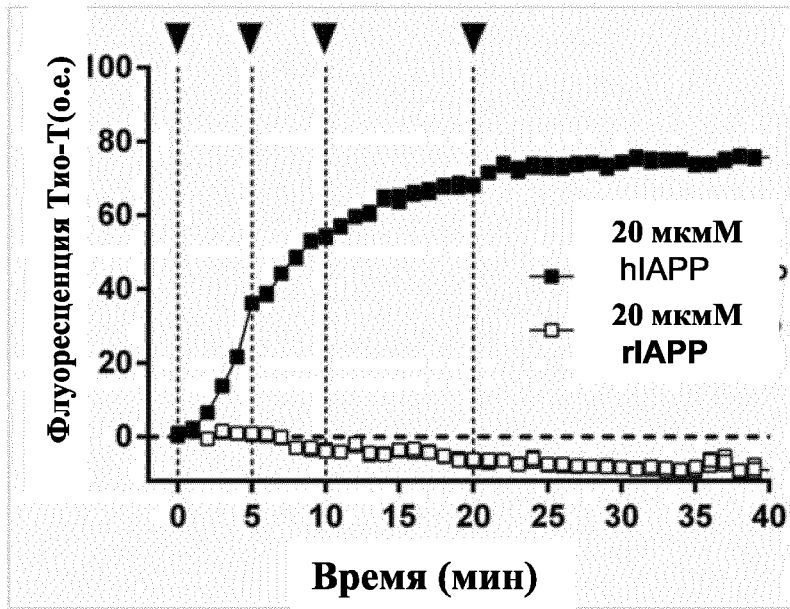


Б

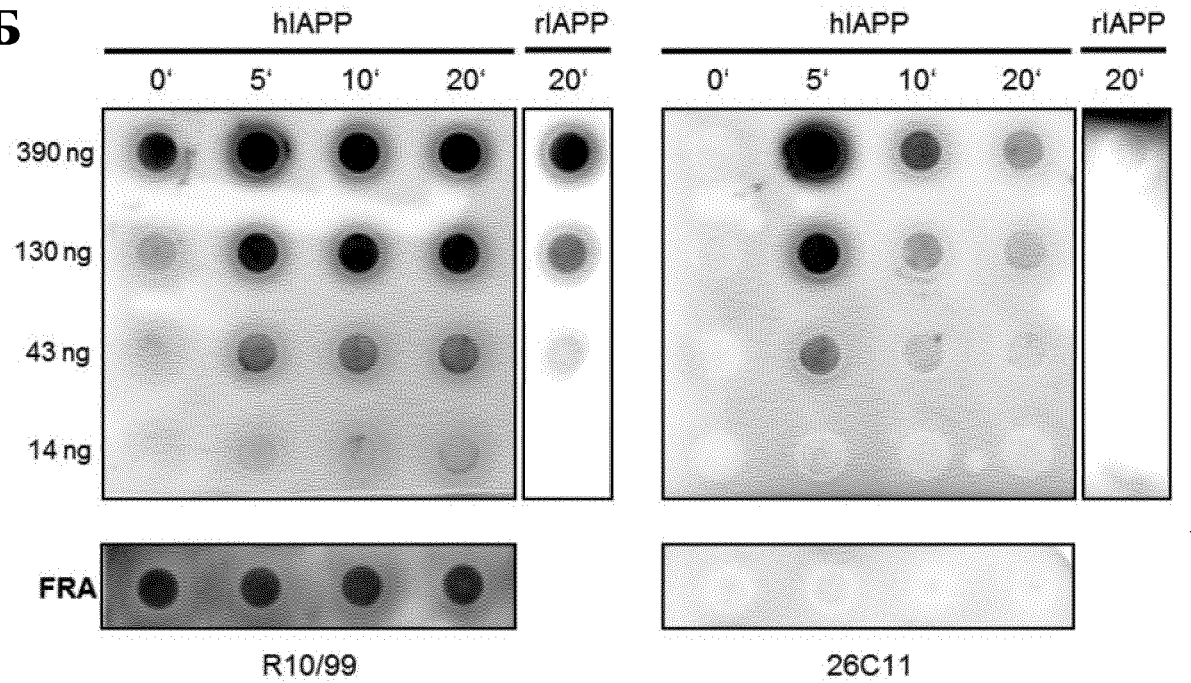




А



Б



В

