(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 043617 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.06

(21) Номер заявки
202091629

(22) Дата подачи заявки
2019.01.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ И ДЕИММУНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА

(31) **18154427.1**
(32) **2018.01.31**
(33) **EP**
(43) **2020.09.23**
(86) **PCT/EP2019/052100**
(87) **WO 2019/149689 2019.08.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВИВОРАЙОН ТЕРАПЬЮТИКС Н.В. (DE)

(72) Изобретатель:
Рафельд Енс-Ульрих (DE), Гиллис Стивен (US), Хеттман Торе, Шиллинг Штефан, Кляйншмидт Мартин (DE)

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

(56) WO-A2-2017009459
Anonymous: "Antitope-Antibody humanization", 9 March 2016 (2016-03-09), XP055256546, Retrieved from the Internet: URL:http://www.antitope.com/anti body-human ization [retrieved on 2016-03-09], the whole document
Anonymous: "Antibody Humanization: Antibody Engineering", 9 March 2016 (2016-03-09), XP055256758, Retrieved from the Internet: URL:https://lakepharma.com/productli st.php ? category=2&secondary=3 [retrieved on 2016-03-09], the whole document
YAGHOUB SAFDARI ET AL.: "Antibody humanization methods - a review and update", BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS, vol. 29, no. 2, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 175-186, XP055250530, GB ISSN: 0264-8725, DOI: 10.1080/02648725.2013.801235, the whole document
SEAN H GAO ET AL.: "Monoclonal antibody humanness score and its applications", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 5 July 2013 (2013-07-05), page 55, XP021156542, ISSN: 1472-6750, DOI: 10.1186/1472-6750-13-55, the whole document

(57) Изобретение относится к гуманизированным и деиммунизированным антителам, которые связываются с эпитопом на N-конце пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида (Aβ N3pE), и к профилактическому и терапевтическому лечению заболеваний и состояний, которые связаны с накоплением и отложением амилоидных пептидов, таких как амилоидоз, являющийся группой нарушений и аномалий, ассоциированных с пироглутаматным вариантом амилоидного пептида, как, например, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия и другие связанные аспекты. Более конкретно оно относится к применению моноклональных антител по изобретению для связывания пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида в плазме крови, головном мозге и спинномозговой жидкости для предупреждения накопления или для регрессии отложения Aβ N3pE в пределах головного мозга и в различных тканях на периферии и для уменьшения выраженности амилоидоза. Изобретение дополнительно относится к диагностическим анализам для проведения диагностики амилоидоза с применением антител по изобретению.

043617 B1

043617 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к гуманизированным и деиммунизированным антителам, которые связываются с эпитопом на N-конце пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида (Aβ N3pE), и к профилактическому и терапевтическому лечению заболеваний и состояний, которые связаны с накоплением и отложением амилоидных пептидов, таких как амилоидоз, являющийся группой нарушений и аномалий, ассоциированных с пироглутаматным вариантом амилоидного пептида, как например болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия и другие связанные аспекты. Более конкретно оно относится к применению моноклональных антител по настоящему изобретению для связывания пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида в плазме крови, головном мозге и спинномозговой жидкости для предупреждения накопления или для регрессии отложения Aβ N3pE в пределах головного мозга и в различных тканях на периферии и для уменьшения выраженности амилоидоза. Настоящее изобретение дополнительно относится к диагностическим анализам для проведения диагностики амилоидоза с применением антител по настоящему изобретению.

Уровень техники

Амилоидоз представляет собой не отдельное заболевание, а скорее группу разнородных прогрессирующих патологических процессов, характеризующаяся внеклеточными отложениями в тканях восковидного крахмалоподобного белка, называемого амилоидом, который накапливается в одном или более органах или системах организма. По мере накопления амилоидных отложений они препятствуют выполнению нормальной функции органом или системой организма. Существует по меньшей мере 15 различных типов амилоидоза. Основными формами являются первичный амилоидоз без известного предшествующего заболевания, вторичный амилоидоз после некоторых других состояний и наследственный амилоидоз.

Вторичный амилоидоз возникает при хроническом инфекционном или воспалительном заболевании, таких как туберкулез, бактериальная инфекция, называемая семейной средиземноморской лихорадкой, инфекции костей (остеомиелит), ревматоидный артрит, воспаление тонкого кишечника (гранулематозный илеит), болезнь Ходжкина и проказа.

Амилоидные отложения включают компонент амилоида P (пятиугольного) (AP), гликопротеин, связанный с нормальным сывороточным амилоидом P (SAP), и сульфатированные гликозаминогликаны (GAG), представляющие собой сложные углеводы соединительной ткани. Амилоидные белковые фибриллы, на которые приходится приблизительно 90% амилоидного материала, содержат один из нескольких различных типов белков. Эти белки способны сворачиваться в так называемые "бета-складчатые" листовые фибриллы, уникальную конфигурацию белка, которая имеет сайты связывания для красителя Конго красный, что обуславливает уникальные свойства окрашивания амилоидного белка.

Многие возрастные заболевания обусловлены амилоидоподобными белками или ассоциированы с ними, и они, в частности, характеризуются образованием внеклеточных отложений амилоидного или амилоидоподобного материала, которые способствуют патогенезу, а также прогрессированию заболевания. Эти болезни включают без ограничения неврологические нарушения, такие как легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна, деменция с тельцами Леви, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию. Другими заболеваниями, которые обусловлены амилоидоподобными белками или ассоциированы с ними, являются прогрессирующий надъядерный парез взора, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), диабет взрослого типа; возрастной кардиоамилоидоз; эндокринные опухоли и другие, включая макулярную дегенерацию.

Хотя патогенез этих заболеваний может отличаться, их характерные отложения часто содержат много общих молекулярных компонентов. В значительной степени это может быть связано с местной активацией провоспалительных сигнальных путей, что приводит к одновременному отложению активированных компонентов комплемента, реактантов острой фазы воспаления, иммуномодуляторов и других медиаторов воспаления (McGeer et al., Tohoku J Exp Med. 174(3): 269-277 (1994)).

Накапливающиеся в последнее время данные демонстрируют вовлечение вариантов Aβ-пептида с N-концевой модификацией при болезни Альцгеймера. Целевые биопсии демонстрируют присутствие Aβ 1-40 и Aβ 1-42 не только в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера, но также и в сенильных бляшках у непораженных индивидуумов. Тем не менее, Aβ N3pE-40/Aβ N3pE-42 с N-концевым усечением и модификацией pyroGlu внедряется почти исключительно в бляшки у пациентов с болезнью Альцгеймера, что делает этот вариант Aβ подходящим диагностическим маркером и потенциальной мишенью для разработки лекарственных средств.

В настоящее время несколько коммерческих производителей предлагают наборы для ELISA, которые позволяют обнаруживать Aβ 1-40/1-42 и Aβ N3pE-40/Aβ N3pE-42 в низком диапазоне в пикограммах (пг).

Головной мозг пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) морфологически характеризуется наличием нейрофибриллярных клубков и отложений Aβ-пептидов в неокортикальных структурах головного мозга (Selkoe, D.J. & Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43, 545-584 (2003)). Aβ-пептиды высвобождаются из амилоидного белка-предшественника (APP) после последовательного расщепления β- и γ-секретазой. Расщепление γ-секретазой приводит к образованию Aβ-пептидов 1-40 и Aβ-пептидов 1-42, которые отличаются своими C-концами и проявляют различную активность в отношении агрегации, образования фибрилл и нейротоксичности (Shin, R.W. et al., Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta 1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. J. Neurosci. 17, 8187-8193 (1997); Iwatsubo, T. et al., Visualization of Abeta 42(43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific Abeta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43). Neuron 13, 45-53 (1994); Iwatsubo, T., Mann, D.M., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. Amyloid beta protein (Abeta) deposition: Abeta 42(43) precedes Abeta 40 in Down syndrome. Ann. Neurol. 37, 294-299 (1995); Hardy, J.A. & Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256, 184-185 (1992); Roβner, S., Ueberham, U., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R. & Bigl, V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. Prog. Neurobiol. 56, 541-569 (1998)).

Большинство Aβ-пептидов, отложившихся в диффузных бляшках, имеют N-концевое усечение или модификацию. Исследования Piccini и Saido показали, что основная структура сенильных бляшек и сосудистых отложений на 50% состоит из модифицированных пироглутаматом (pyroGlu) пептидов(Piccini et al., J Biol Chem. 2005 Oct 7; 280(40):34186-92; Saido et al., Neuron. 1995 Feb; 14(2): 457-66). Пептиды, модифицированные pyroGlu, являются в большей степени цитотоксичными по сравнению с другими формами молекул Aβ, и они устойчивы к аминопептидазам (Russo et al., J Neurochem. 2002 Sep; 82(6):1480-9). Таким образом, молекулы формы pyroGlu-Aβ имеют более длительный период полужизни, в результате чего накопление этих молекул данной формы и образование нейротоксических олигомеров, а также агрегатов является преимущественным(Saido, Neurobiol Aging. 1998 Jan-Feb; 19(1 Suppl):S69-75). Из-за циклизации глутамата до pyroGlu будут утрачиваться заряженные аминокислоты, что резко уменьшает растворимость пептида и вызывает повышенную склонность к агрегации. Исследования in vitro показали, что исходная олигомеризация, например Aβ3(pE), проходит намного быстрее по сравнению с немодифицированными пептидами (Schilling et al., Biochemistry. 2006 Oct 17;45(41): 12393-9). Aβ-пептиды N3pE-42 существуют совместно с Aβ-пептидами 1-40/1-42 (Saido, T.C. et al., Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Abeta N3pE, in senile plaques. Neuron 14, 457-466 (1995); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. Neurosci. Lett. 215, 173-176 (1996)), и на основании ряда наблюдений это может играть заметную роль в патогенезе AD. Например, было показано, что охарактеризованная определенная нейротоксичность Aβ-пептидов N3pE-42 (Russo, C. et al. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem. 82, 1480-1489 (2002) и pE-модификация N-усеченных Aβ-пептидов придает устойчивость к разрушению большинством аминопептидаз, а также Aβ-разрушающими эндопептидазами (Russo, C. et al., Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem. 82, 1480-1489 (2002); Saido, T.C. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. Neurobiol. Aging 19, S69-S75 (1998)). Циклизация глутаминовой кислоты до pE приводит к потере N-концевого заряда, что ускоряет агрегацию Aβ N3pE по сравнению с немодифицированными Aβ-пептидами (He, W. & Barrow, C.J. The Abeta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. Biochemistry 38, 10871-10877 (1999); Schilling, S. et al. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). Biochemistry 45, 12393-12399 (2006)). Таким образом, снижение образования Aβ N3pE-42 должно приводить к дестабилизации пептидов, делая их более доступными для деградации, и, в свою очередь, к предупреждению образования более высокомолекулярных агрегатов Aβ и к повышению выживаемости нейронов.

Однако в течение длительного времени не было известно, как именно происходит pE-модификация Aβ-пептидов. В недавнее время было обнаружено, что глутаминилциклаза (QC) способна катализировать образование Aβ N3pE-42 в слабокислых условиях и что специфические ингибиторы QC предупреждают образование Aβ N3pE-42 in vitro (Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M. & Demuth, H.-U. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. FEBS Lett. 563, 191-196 (2004); Cynis, H. et al. Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 1764, 1618-1625 (2006)).

Все факты свидетельствуют о том, что pyroGlu Aβ является своего рода зародышем для инициализации образования фибрилл. В другом исследовании (Piccini et al., 2005, выше) добровольцев с отложениями бляшек, но без специфической патологии AD, можно было отличить от пациентов с AD по характерному количеству форм молекул Aβ. Таким образом, количество модифицированных pyroGlu пепти-

дов с N-концевым усечением было значительно выше в головном мозге пациентов с AD.

Посттрансляционное образование pyroGlu в положении 3 или 11 Aβ-пептида подразумевает циклизацию N-концевого остатка глутамата. Глутаминилциклаза (QC) играет важную роль в образовании pyroGlu-пептидов. QC широко распространена в растительном и животном мире и, в частности, принимает участие в созревании пептидных гормонов. Циклизация глутамина путем высвобождения аммиака и глутамата путем высвобождения воды до pyroGlu осуществляется с помощью QC. В отличие от циклизации глутамина, циклизация глутамата происходит не спонтанно. QC катализирует эффективную (нежелательную) побочную реакцию от глутамата до pyroGlu. Образовавшийся остаток pyroGlu защищает белок от протеолитической деградации. Имеется несколько литературных источников, которые показывают, что QC играет важную роль в образовании pyroGlu-Aβ:

1) в нескольких исследованиях было показано, что QC катализирует образование остатков pyroGlu из глутамата на N-конце Aβ (Cynis et al., Biochim Biophys Acta. 2006 Oct; 1764(10): 1618-25, Schilling et al., FEBS Lett. 2004 Apr 9;563(l-3): 191-6);

2) как Aβ-пептиды, так и QC экспрессируются в больших количествах в гиппокампе и коре. Эти области головного мозга подвержены особому риску поражения при AD (Pohl et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1991 Nov 15;88(22):10059-63, Selkoe, Physiol Rev. 2001 Apr; 81(2):741-66);

3) APP расщепляется β-секретазой в ходе транспортировки к плазматической мембране, за счет чего может быть получен N-конец Aβ со свободным остатком глутамата (Greenfield et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Jan 19; 96(2):742-7). В секреторных везикулах определяли совместную локализацию процессированного APP и QC. Таким образом, в слабокислой среде везикул может происходить ускоренная модификация остатка глутамата до пироглутамата;

4) другие нейродегенеративные заболевания (семейная датская (FDD) или британская деменция (FBD)) также связаны с модифицированными на N-конце pyroGlu-пептидами, например Bri2, но в то же время они не связаны с Aβ по своей первичной структуре (Vidal R. et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 4920-4925).

Возможно, что катализируемое QC образование pyroGlu-Aβ вовлечено в развитие и прогрессирование нейродегенеративных заболеваний. Образование модифицированных на N-конце амилоидных пептидов, безусловно, является фундаментальным фактором в процессе агрегации Aβ и может быть началом заболевания. Подавление образования pyroGlu-Aβ путем ингибирования QC может представлять собой терапевтический подход. Ингибиторы QC были бы способны предупредить образование pyroGlu-Ap, снизить концентрацию пироглутаматного варианта Aβ в головном мозге и таким образом задерживать олигомеризацию Aβ-пептидов. Schilling et al. показывают, что экспрессия QC активируется в коре пациентов с AD и коррелирует с появлением pyroGlu-модифицированного Aβ-пептида. Пероральное применение ингибитора QC привело к снижению уровня модифицированного пироглутаматом AβpE(3-42) в двух разных трансгенных мышиных моделях AD и в новой модели Drosophila (Schilling et al., 2008 Biol. Chem. (389), 983-991).

Деменция с тельцами Леви (LBD) является нейродегенеративным нарушением, которое может возникать у лиц старше 65 лет, и оно, как правило, вызывает симптомы когнитивных (мыслительных) нарушений и аномальные изменения поведения. Симптомы могут включать когнитивные нарушения, неврологические признаки, расстройство сна и вегетативную недостаточность. В большинстве случаев когнитивные нарушения являются характерной особенностью LBD. У пациентов имеются рекуррентные эпизоды замешательства, которые постепенно ухудшаются. Изменения когнитивных способностей часто ассоциированы со смещением степени внимания и бдительности. Когнитивные нарушения и колебания мышления могут меняться в течение нескольких минут, часов или дней. Тельца Леви образуются из фосфорилированных и нефосфорилированных нейрофиламентных белков; они содержат синаптический белок альфа-синуклеин, а также убиквитин, который вовлечен в устранение поврежденных или аномальных белков. В дополнение к тельцам Леви также могут присутствовать нейриты Леви, которые представляют собой тельца-включения в клеточных процессах нервных клеток. Амилоидные бляшки могут образовываться в головном мозге пациентов, пораженных DLB, однако они, как правило, меньше, чем у пациентов с болезнью Альцгеймера. Нейрофибриллярные клубки, другой микропатологический признак AD, не являются главной характеристикой LBD, но часто присутствуют в дополнение к амилоидным бляшкам.

Боковой амиотрофический склероз (ALS) характеризуется дегенерацией верхних и нижних двигательных нейронов. У некоторых пациентов с ALS может присутствовать деменция или афазия (ALS-D). Деменция чаще всего представляет собой лобно-височную деменцию (FTD), и во многих из этих случаев имеются убиквитин-положительные, тау-отрицательные включения в нейронах зубчатой извилины и поверхностных слоев лобной и височной долей.

Миозит с включениями (IBM) является приводящим к инвалидности заболеванием, которое обычно встречается у людей старше 50 лет, при котором в мышечных волокнах развивается воспаление и начинается атрофия, но мозг не затрагивается и пациенты полностью сохраняют свой интеллект. Было обнаружено, что уровни двух ферментов, вовлеченных в продуцирование β-амилоидного белка, повышены

внутри мышечных клеток пациентов с этим наиболее распространенным прогрессирующим мышечным заболеванием пожилых людей, при котором уровень β-амилоида также повышен.

Другое заболевание, которое обусловлено накоплением и отложением амилоидоподобного белка или ассоциировано с ним, представляет собой макулярную дегенерацию. Макулярная дегенерация является распространенным заболеванием глаз, вызывающим повреждение макулы, которая представляет собой центральную область сетчатки (толщиной с бумажный лист ткань на глазном дне, где светочувствительные клетки посылают визуальные сигналы в головной мозг). Четкое, ясное "центральное" зрение обрабатывается макулой. Повреждение макулы приводит к развитию слепых пятен и размытости или искажению зрения. Возрастная макулярная дегенерация (AMD) является основной причиной нарушения зрения в Соединенных Штатах, а у людей старше 65 лет она является основной причиной гражданской слепоты среди европеоидной расы. Примерно у 1,8 миллиона американцев в возрасте от 40 лет и старше имеется прогрессирующая AMD, а еще у 7,3 миллиона человек с промежуточной AMD имеется значительный риск потери зрения. По оценкам правительства к 2020 году будет 2,9 миллиона человек с прогрессирующей AMD. Жертвы AMD часто удивляются и расстраиваются, узнавая, насколько мало известно о причинах и лечении этого приводящего к слепоте состояния.

Существуют две формы макулярной дегенерации: сухая форма макулярной дегенерации и влажная форма макулярной дегенерации. Сухая форма, при которой клетки макулы начинают медленно разрушаться, диагностируется в 85 процентах случаев макулярной дегенерации. Оба глаза обычно поражаются сухой формой AMD, хотя один глаз может ослепнуть, в то время как другой глаз остается неповрежденным. Друзы, которые представляют собой желтые отложения под сетчаткой, являются типичными ранними признаками сухой формы AMD. Риск развития поздней стадии сухой формы AMD или влажной формы AMD увеличивается по мере увеличения количества или размера друз. Вероятно, что сухая форма AMD будет прогрессировать и вызывать потерю зрения, не переходя во влажную форму заболевания; однако также возможно, что на ранней стадии сухая форма AMD внезапно перейдет во влажную форму.

Влажная форма, хотя она составляет только 15 процентов случаев, приводит у 90 процентов к слепоте и считается поздней стадией AMD (отсутствует ранняя или промежуточная стадия влажной формы AMD). Влажной форме AMD всегда предшествует сухая форма заболевания. По мере того как сухая форма ухудшается, у некоторых людей появляются аномально развивающиеся кровеносные сосуды, растущие позади макулы. Эти сосуды очень хрупкие и будут пропускать жидкость и кровь (отсюда "влажная" макулярная дегенерация), что приводит к быстрому повреждению макулы.

Сухая форма AMD исходно зачастую вызывает небольшое помутнение зрения. Затем центр поля зрения, в частности, может стать размытым, и эта область разрастается по мере прогрессирования заболевания. Если поражен только один глаз, то симптомы могут отсутствовать. При влажной форме AMD прямые линии могут казаться неровными и может быстро наступить потеря центрального зрения.

Диагностика макулярной дегенерации обычно включает в себя тщательную проверку зрения и осмотр глаз, проверку остроты зрения и осмотр глазного дна с помощью процедуры, называемой офтальмоскопия, чтобы помочь диагностировать AMD, а при подозрении влажной формы AMD может также проводиться флуоресцентная ангиография. В случае развития поздних стадий сухой формы AMD в настоящее время отсутствует какое-либо лечение для предупреждения потери зрения. Однако специфический состав с высокими дозами антиоксидантов и цинка может задержать или предупредить прогрессирование промежуточной стадии AMD до поздней стадии. С использованием Macugen® (инъекции пегаптаниба натрия), лазерной фотокоагуляции и фотодинамической терапии можно контролировать аномальный рост кровеносных сосудов и кровотечение в макуле, что полезно для некоторых людей с влажной формой AMD; однако зрение, которое уже утрачено, этими методиками восстановить невозможно. Если зрение уже утрачено, существуют вспомогательные средства для слабого зрения, которые могут помочь улучшить качество жизни.

Одним из наиболее ранних признаков возрастной макулярной дегенерации (AMD) является накопление внеклеточных отложений, известных как друзы, между базальной мембраной пигментного эпителия сетчатки (RPE) и мембраной Бруха (BM). Недавние исследования, проведенные Anderson et al., подтвердили, что друзы содержат бета-амилоид. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243 - 256).

Было показано, что пироглутаматные варианты Aβ-пептидов играют ключевую роль в накоплении Aβ-пептидов и формировании бляшек при болезни Альцгеймера. Было показано, что из-за своего гидрофобного потенциала эти пептиды способствуют агрегации и образованию бляшек. Кроме того, было показано, что в трансгенной мышиной модели с экспрессией Aβ N3pE-42 в нейронах этот пептид является нейротоксичным in vivo и приводит к потере нейронов (Wirths et al. (2009) Acta Neuropatho/118, 487-496).

Считается, что антитела со специфичностью к N-концевому пироглутамату Aβ-пептидов являются предпочтительными из-за их специфичности только к патогенным формам молекул Aβ, которые несут пироглутамат на N-конце, но без распознавания APP или других форм молекул Aβ без N-концевого пироглутамата. Таким образом, считается, что риск возникновения потенциальных побочных эффектов, таких как не поддающееся контролю воспаление тканей головного мозга, будет снижен за счет применения антител по настоящему изобретению по сравнению с антителами, направленными на другие формы

молекул Aβ, которые не являются пироглутаматными вариантами.

Известны антитела, нацеливающиеся на Aβ-пептиды N3pE (Acero et al. (2009) J Neuroimmunol 213, 39-46; Saido et al. (1996) Neuron 14, 457-466; патентные документы США № 7122374 и WO 2012/136552).

Однако существует потребность в гуманизированных и деиммунизированных антителах со специфичностью к Aβ-пептидам N3pE, которые можно использовать в лечении человека и которые оказывают положительный эффект в отношении амилоидоза, в частности в отношении когнитивных функций при заболеваниях и состояниях, в которые может быть вовлечен Aβ N3pE, таких как клиническая или доклиническая стадия болезни Альцгеймера, синдром Дауна и клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии.

Исходное антитело для антитела по настоящему изобретению является вариантом клона № 6, раскрытого в WO 2017/009459, который имеет вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1), которая раскрыта под SEQ ID NO: 14 в WO 2017/009459;

и который имеет вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSN GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 49), которая раскрыта под SEQ ID NO: 27 в WO 2017/009459.

Однако с данным вариантом клона № 6, как раскрыто в WO 2017/009459, не было возможности обеспечить изготовление в соответствии с CMC. В частности, и несмотря на несколько попыток, устойчивые клеточные клоны не были получены для клеток CHO-DG44, при этом наблюдалась только слабая временная экспрессия (с получением недостаточного количества антител) данного варианта клона № 6 и не была достигнута устойчивая экспрессия, являющаяся необходимым условием для изготовления в соответствии с CMC.

Краткое описание изобретения

Следовательно, целью настоящего изобретения было обеспечение гуманизированных и деиммунизированных антител с улучшенными свойствами для преодоления недостатков антител из предыдущего уровня техники.

В целом, в настоящем изобретении предусмотрены новые способы и композиции, предусматривающие высокоспецифичные и высокоэффективные антитела, в том числе химерные антитела и их фрагменты, в том числе частично или полностью гуманизированные антитела и их фрагменты, обладающие способностью специфически распознавать и связываться с конкретными эпитопами из ряда β-амилоидных антигенов, в частности Aβ-пептидов N3pE, которые могут быть презентированы антителу в мономерной, димерной, тримерной и т. д. или полимерной форме, в виде агрегата, волокон, нитей или в уплотненной форме бляшки.

В частности, цель настоящего изобретения достигается с помощью антитела или его функционального варианта, где вариабельная часть легкой цепи указанного антитела содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1),

и где вариабельная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 2).

Вариабельная часть тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2) содержит три мутации по положениям K12V, S14P и N55D по сравнению с исходным антителом, раскрытым в WO 2017/009459.

Неожиданно было установлено, что введение этих трех точечных мутаций приводит к получению гуманизированного и деиммунизированного антитела, которое пригодно к изготовлению в соответствии с CMC с высоким выходом. Удалось получить продуцирующие антитела клеточные линии из клеток CHO-DG44 для антител по настоящему изобретению, содержащих данные три точечные мутации. Дополнительно удалось обеспечить улучшенную временную экспрессию в CHO-DG44, приводящую к более высоким выходам антитела по настоящему изобретению, содержащего мутации K12V, S14P и N55D по сравнению с исходным антителом, при сохранении благоприятных характеристик связывания антитела. Наконец, можно обеспечить устойчивую экспрессию антитела по настоящему изобретению, содержащего мутации K12V, S14P и N55D, с высокими уровнями экспрессии, позволяющими осуществлять получение в соответствии с CMC.

Настоящее изобретение предусматривает гуманизированные и деиммунизированные антитела или их фрагменты, которые оказывают положительное влияние на заболевания и состояния, связанные с амилоидозом, в которые может быть вовлечен Aβ N3pE.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их фрагменты, которые связываются с Aβ-пептидами N3pE в кровотоке и ткани, в частности в головном мозге. Антитела по настоящему изобретению способны связывать свободные молекулы Aβ-пептидов N3pE или даже связанные формы Aβ-пептидов N3pE.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела, которые изменяют клиренс растворимых и связанных форм Aβ-пептидов N3pE в центральной нервной системе, как например в головном мозге, и в кровотоке, как например в плазме крови.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их фрагменты, где антитела специфически связываются с несущим пироглутамат N-концом Aβ N3pE.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их фрагменты, где антитела показывают повышенную селективность в отношении олигомеров и/или фибрилл Aβ-пептидов. Антитела по настоящему изобретению демонстрируют многократно, как, например, в 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 или более чем 250 раз, более низкую величину константы связывания (значение K_D) в отношении связывания с олигомерами и/или фибриллами Aβ (1-42), чем у сопоставимых моноклональных антител, известных из предыдущего уровня техники, в частности по сравнению с исходным антителом, раскрытым в WO 2017/009459. Соответственно, антитела по настоящему изобретению, которые получали для селективного связывания с Aβ-пептидами N3pE, являются более специфичными в отношении Aβ-пептидов N3pE и показывают пониженную перекрестную реактивность в отношении Aβ-пептидов, отличных от Aβ N3pE.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам-хозяевам, трансформированным векторами или содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, которые экспрессируют антитела по настоящему изобретению или их фрагменты.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие антитела по настоящему изобретению и их фрагменты.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению антител по настоящему изобретению и их фрагментов, применимых для связывания с Aβ N3pE и его выведения или удаления у людей и, таким образом, для диагностики, предупреждения и лечения заболеваний и состояний, характеризующихся амилоидозом или токсичностью Aβ N3pE.

В конкретном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению, которые способны связываться с Aβ-пептидами N3pE и выводить или удалять их в биологических жидкостях и тканях, применимы для предупреждения и/или лечения состояний, ассоциированных с образованием Aβ N3pE-содержащих бляшек, таких как диффузные, нейритные и цереброваскулярные бляшки в головном мозге.

Введение антител по настоящему изобретению, в том числе их иммунологически реакционноспособных фрагментов, может привести к выведению или удалению Aβ N3pE из вышеупомянутых бляшек или других биологических комплексов. Таким образом, антитело по настоящему изобретению будет с легкостью транспортироваться в кровоток, другие биологические жидкости и в места, где образуются вышеупомянутые бляшки и/или другие биологические комплексы, или куда-либо еще, где Aβ N3pE проявляет повреждающие эффекты.

Кроме того, удаление Aβ N3pE из бляшек или других биологических комплексов с помощью антител по настоящему изобретению может привести к солюбилизации нерастворимых форм бляшек и, таким образом, привести к удалению цельных бляшек из пораженной ткани, такой как ткань головного мозга. Это, в свою очередь, может привести к улучшению когнитивных функций у пациентов с диагнозом нейродегенеративное заболевание, такое как легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD) или другие, нейродегенерация при синдроме Дауна, деменция с тельцами Леви, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию. В частности, настоящее изобретение предусматривает антитело по настоящему изобретению для применения в лечении состояния, выбранного из продромальной AD, AD легкой степени, AD средней степени и AD тяжелой степени.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитело по настоящему изобретению для применения в замедлении снижения когнитивных способностей у пациента с диагностированным состоянием, выбранным из клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии.

Связывание антител по настоящему изобретению с Aβ N3pE в кровотоке или других жидкостях организма может дополнительно привести к удалению циркулирующих или растворимых форм Aβ N3pE. Как обсуждалось выше, Aβ N3pE обладает высокой гидрофобностью и имеет высокое сродство к дру-

гим, например непироглутаматным, Aβ-пептидами, что приводит к образованию олигомерных и надмолекулярных структур, таких как амилоидные бляшки. Было показано, что, в частности, эти олигомерные структуры обладают высокой нейротоксичностью. Образование олигомерных структур приводит к повреждению клеток и гибели нейронных клеток. Таким образом, удаление циркулирующих или растворимых форм Aβ N3pE или даже олигомеров, содержащих Aβ N3pE, приводит к предупреждению повреждения клеток и/или нейротоксичности. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способы предупреждения нейродегенеративного заболевания, такого как легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD) или другие, нейродегенерация при синдроме Дауна, деменция с тельцами Леви, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию. В частности, настоящее изобретение предусматривает способы лечения состояния, выбранного из продромальной AD, AD легкой степени, AD средней степени и AD тяжелой степени.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ замедления снижения когнитивных способностей у пациента с диагностированным состоянием, выбранным из клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы предупреждения и/или лечения других заболеваний, которые обусловлены амилоидоподобными белками или ассоциированы с ними, в частности Aβ N3pE, таких как прогрессирующий надъядерный парез взора, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), деменция, связанная с диабетом взрослого типа; возрастной кардиоамилоидоз и другие, включая макулярную дегенерацию.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает высокочувствительную и одновременно надежную методику выявления, которая позволяет количественно определять варианты Aβ, в частности Aβ N3pE, в биологических образцах, например образцах ликвора или сыворотки крови, предпочтительно в образцах сыворотки крови или образцах ткани. Это представляет собой серьезную задачу, учитывая низкий уровень этих Aβ-пептидов N3pE в крови. Однако наличие такой доступной методики выявления является предпосылкой для изучения эффективности низкомолекулярных ингибиторов в программах скрининга и разработки лекарственных средств.

Антитела, обеспечиваемые в соответствии с идеями настоящего изобретения, особенно полезны для диагностики амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая без ограничения, неврологические нарушения, такие как болезнь Альцгеймера (AD), деменция с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (голландского типа), комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, а также другие заболевания, которые основаны на амилоидоподобных белках или связаны с ними, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, наследственное кровоизлияние в головной мозг голландского типа, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), деменция, связанная с диабетом взрослого типа; возрастной сердечный амилоидоз и другие, включая макулярную дегенерацию, к примеру.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показано влияние точечных мутаций в тяжелой цепи на временную экспрессию (A) и связывание мишени (B) для отдельных вариантов антитела по настоящему изобретению. Все тестируемые антитела содержат вариабельную часть легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и мутацию K324A в тяжелой цепи.

Ab 1: содержит две мутации K12V и S14P в вариабельной части тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью под SEQ ID NO: 49;

Ab 2: содержит мутацию N55D в вариабельной части тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью под SEQ ID NO: 49;

Ab 3: представляет собой исходную последовательность под SEQ ID NO: 49 вариабельной части тяжелой цепи без каких-либо мутаций.

На фиг. 2 показано влияние точечных мутаций в тяжелой цепи на временную экспрессию (A) и связывание мишени (B) для отдельных вариантов антитела по настоящему изобретению. Все тестируемые антитела содержат вариабельную часть легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и мутацию K324A в тяжелой цепи.

Ab 1: содержит две мутации K12V и S14P в вариабельной части тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью под SEQ ID NO: 49;

Ab 2: содержит мутацию N55D в вариабельной части тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью под SEQ ID NO: 49;

Ab 3: содержит три мутации K12V, S14P и N55D в вариабельной части тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью под SEQ ID NO: 49.

На фиг. 3 показаны клоны CHO-DG44, экспрессирующие антитело с вариабельной частью легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и вариабельной частью тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2, через семь, десять и 13 дней после засева лунок 24-луночного планшета из колоний, отобранных из 96-луночного планшета.

На фиг. 4 показаны титры экспрессии для CHO-DG44 после амплификации генов путем воздействия MTX (день 7).

Подробное описание изобретения

Определения.

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и конкретно охватывает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), полученные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител в той степени, пока они проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может представлять собой IgM, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgD, IgA или IgE, к примеру. Однако предпочтительно, чтобы антитело не являлось антителом IgM.

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, обычно антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты: диатела; молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Термин "моноклональное антитело", используемый в данном изобретении, относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов "поликлонального антитела", которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности моноклональные антитела часто могут быть полезны тем, что они синтезируются гибридомной культурой, неконтаминированной другими иммуноглобулинами. Термин "моноклональное" указывает на характер антитела, которое получают из по сути однородной популяции антител, и его нельзя истолковывать как требующий продуцирования антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью гибридомного способа, впервые описанного Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены общеизвестными способами с использованием рекомбинантной ДНК. "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с помощью методик, описанных в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), к примеру.

Моноклональные антитела в данном изобретении конкретно включают химерные антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител до той степени, пока они проявляют требуемую биологическую активность.

"Гуманизированные" формы не являющихся человеческими (например, мышиных) антител представляют собой иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Гуманизированные антитела преимущественно являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентное антитело), в которых остатки из участка, определяющего комплементарность (CDR), реципиента заменяют остатками из CDR отличных от человека видов (донорское антитело), таких как мышь, крыса или кролик, имеющих требуемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных участков.

Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения и оптимизации эффективности антител. В целом гуманизированное антитело будет содержать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по сути все участки CDR соответствуют участкам иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по сути все участки FR представляют собой участки из последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al.,

Nature, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., Nature. 332:323-329 (1988) и Presta, Curr. Op. Struct. Biel., 2:593-596 (1992).

В дополнение к "гуманизации" "деиммунизация" включает другие изменения, такие как удаление Т-клеточных эпитопов.

Термин "терапевтически эффективное количество", применяемый в данном изобретении и в прилагаемой формуле изобретения, означает, что количество введенного антитела является достаточным количеством для достижения предполагаемой цели, такой как, в данном случае, по меньшей мере удаление циркулирующих или растворимых форм пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида (Aβ N3pE) и его вариантов, но предпочтительно выведение или удаление Aβ-пептида N3pE из бляшек или других биологических комплексов. Или более предпочтительно уменьшение нагрузки бляшками и/или удаление цельных бляшек из пораженной ткани, такой как ткань головного мозга.

"Одноцепочечные Fv" или "sFv"-фрагменты антитела содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv сформировать требуемую структуру для связывания антигена. Для обзора sFv см. Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VD) в той же полипептидной цепи (VH-VD) При использовании линкера, слишком короткого, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела описаны более полно в Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sol. USA, 90:6444-6448 (1993).

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента своего природного окружения. Контаминирующими компонентами из его природного окружения являются материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела и они могут включать ферменты, гормоны и другие растворенные вещества белковой или небелковой природы. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более 95% по весу антитела, как определено по способу Лоури, и наиболее предпочтительно более 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности с помощью SDS-PAGE при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания кумасси синим или предпочтительно серебром. Выделенное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело будет получено по меньшей мере на одной стадии очистки.

Используемые в данном изобретении выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают в себя первичную исследуемую клетку и культуру, полученную из нее, без учета количества переносов. Также понятно, что все потомство не может быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включено мутантное потомство, которое обладает той же функцией или биологической активностью, что и подвергнутая первоначальному трансформированная клетка. Там, где предполагаются разные обозначения, это будет понятно из контекста.

Используемые в данном изобретении термины "полипептид", "пептид" и "белок" являются взаимозаменяемыми и определяются как означающие биомолекулу, состоящую из аминокислот, связанных пептидной связью.

Если в данном изобретении упоминаются пептиды или аминокислотные последовательности, каждый аминокислотный остаток представлен однобуквенным или трехбуквенным обозначением, соответствующим тривиальному названию аминокислоты, в соответствии со следующим условным перечнем:

Аминокислота	Однобуквенный символ	Трехбуквенный символ
Аланин	A	Ala
Аргинин	R	Arg
Аспарагин	N	Asn
Аспарагиновая кислота	D	Asp
Цистеин	C	Cys
Глутамин	Q	Gln
Глутаминовая кислота	E	Glu
Глицин	G	Gly
Гистидин	H	His
Изолейцин	I	Ile
Лейцин	L	Leu
Лизин	K	Lys
Метионин	M	Met
Фенилаланин	F	Phe
Пролин	P	Pro
Серин	S	Ser
Треонин	T	Thr
Триптофан	W	Trp
Тирозин	Y	Tyr
Валин	V	Val

Используемые в данном изобретении термины единственного числа определяются как означающие "один или более" и включают множественное число, за исключением случаев несоответствия контексту.

Фраза "заболевания и нарушения, вызванные амилоидными или амилоидоподобными белками или ассоциированные с ними" включает без ограничения заболевания и нарушения, вызванные присутствием или активностью амилоидоподобных белков в мономерном, фибриллярном или полимерном состоянии, или любой комбинации из этих трех. Такие заболевания и нарушения включают без ограничения амилоидоз, эндокринные опухоли и макулярную дегенерацию.

Термин "амилоидоз" относится к группе заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая без ограничения вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, такие заболевания, как включая без ограничения неврологические расстройства, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся потерей емкости когнитивной памяти, такие как, например, легкое когнитивное нарушение (MCI), спорадическая болезнь Альцгеймера, деменция с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию, семейные формы болезни Альцгеймера, как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками или связаны с ними, такие как прогрессирующий надъядерный паралич взора, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), миозит с включениями (IBM), диабет взрослого типа и возрастной кардиоамилоидоз, и различные заболевания глаз, включая макулярную дегенерацию, связанную с друзами нейропатию зрительного нерва и катаракту вследствие отложения бета-амилоида.

"Амилоид β, Aβ или β-амилоид" является признанным в данной области термином и относится к белкам и пептидам β-амилоида, белку-предшественнику β-амилоида (APP), а также к их модификациям,

фрагментам и любым функциональным эквивалентам. В частности, под используемым в данном изобретении β-амилоидом подразумевают любой фрагмент, продуцируемый при протеолитическом расщеплении APP, но особенно те фрагменты, которые вовлечены в амилоидную патологию или ассоциированы с ней, включая без ограничения $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$. Аминокислотные последовательности этих Aβ-пептидов следующие:

Aβ 1-42 (SEQ ID NO: 37):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala,

Aβ 1-40 (SEQ ID NO: 38):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val,

Aβ 1-38 (SEQ ID NO: 39):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly.

"pGlu-Aβ" или "Aβ N3pE" относится к усеченным с N-конца формам Aβ, которые начинаются с остатка глутаминовой кислоты в положении 3 в аминокислотной последовательности Aβ, и где указанный остаток глутаминовой кислоты циклизируется с образованием остатка пироглутаминовой кислоты. В частности, под используемыми в данном изобретении pGlu-Aβ или Aβ N3pE подразумевают те фрагменты, которые вовлечены в амилоидную патологию или ассоциированы с ней, включая без ограничения pGlu-$A\beta_{3-38}$, pGlu-$A\beta_{3-40}$, p-Glu-$A\beta_{3-42}$.

Последовательности усеченных с N-конца форм Aβ, $A\beta_{3-38}$, $A\beta_{3-40}$, $A\beta_{3-42}$ следующие:

Aβ 3-42 (SEQ ID NO: 40):

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala,

Aβ 3-40 (SEQ ID NO: 41):

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val,

Aβ 3-38 (SEQ ID NO: 42):

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly.

Настоящее изобретение относится к антителам, специфичным для Aβ-пептидов человека, которые усечены с N-конца путем отщепления или потери аминокислот № 1 и 2 с N-конца, и в которых таким образом незащищенная N-концевая аминокислота № 3 модифицирована с образованием пироглутамата, и которые вследствие этого несут остаток пироглутамата в положении 3 с N-конца (далее называемых Aβ-пептидами N3pE, или N3pE-AP-пептидами, или пироглутаматными вариантами Aβ-пептидов).

В первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, в котором вариабельная часть легкой цепи указанного антитела содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1),

и где вариабельная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 2).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вариа-

бельную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L: SSQSLLYSDGKTYLN (SEQ ID NO: 3);

CDR2 V_L: LVSKLDS (SEQ ID NO: 4) и

CDR3 V_L: VQGTHFP (SEQ ID NO: 5).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вариабельную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 V_H: LINPSDGVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 7) и

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 8).

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает легкие цепи и тяжелые цепи антитела по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет легкую цепь, где легкая цепь содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 17).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD
GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 19).

C1q, и две сериновые протеазы, C1r и C1s, образуют комплекс C1, представляющий собой первый компонент пути комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). C1q представляет собой шестивалентную молекулу с молекулярной массой, составляющей примерно 460000, и структурой, подобной букету тюльпанов, в котором шесть коллагеновых "стеблей" соединены с шестью участками глобулярных головок (Burton and Woof, Advances in Immunol 51:1-84; 1992). Связывание молекул IgG1 с C1q инициирует активацию комплемента, а затем приводит к опосредованному комплементом лизису клеток. Антитела по настоящему изобретению подлежат использованию для лечения воспалительных заболеваний и состояний, т.е. антитела по настоящему изобретению должны обладать противовоспалительными свойствами.

Эффекторные функции антител по настоящему изобретению также могут быть опосредованы взаимодействием Fc-участка антитела с Fc-рецепторами (FcR), которые являются специализированными рецепторами клеточной поверхности на гемопоэтических клетках. Fc-рецепторы относятся к надсемейству иммуноглобулинов и, как было показано, опосредуют как удаление патогенов, покрытых антителами, путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) (Van de Winkel and Anderson, J. Leuk. Bioi. 49:511-24; 1991).

В связи с этим настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела, которые все еще связываются с Fc-рецепторами для выполнения своих эффекторных функций. Но предпочтительно, чтобы антитела по настоящему изобретению не проявляли комплемент-зависимой цитотоксичности. Более предпочтительно, чтобы антитела по настоящему изобретению не активировали систему комплемента, а скорее подавляли лизис клеток, опосредованный комплементом.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления в антителах по настоящему изобрете-

нию имеется Fc-участок IgG человека, который предусматривает одну или более аминокислотных замен, предпочтительно замену 3 или 2 аминокислот, наиболее предпочтительно замену одной аминокислоты. Аминокислотные замены можно осуществить с помощью обычных способов, таких как сайт-направленный мутагенез Fc-участка IgG1 человека антител по настоящему изобретению.

В более предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению имеют Fc-участок IgG человека, который предусматривает аминокислотную замену по положению 324, как показано в SEQ ID NO: 18 [положение 324 соответствует положению 322 в соответствии со схемой нумерации EU, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); Edelman et al., PNAS USA 63:78-85 (1969)]. Аминокислотная замена предпочтительно представляет собой K324A.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет тяжелую цепь, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD

GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ

GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKA

KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID

NO: 18).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предпочтительными являются антитела, содержащие, по сути состоящие из или состоящие из следующих комбинаций вариабельных частей легкой цепи и тяжелой цепи и легкой цепи и тяжелой цепи:

A) вариабельная часть легкой цепи: SEQ ID NO: 1 вариабельная часть тяжелой цепи: SEQ ID NO: 2 легкая цепь: SEQ ID NO: 17 тяжелая цепь: SEQ ID NO: 19;

B) вариабельная часть легкой цепи: SEQ ID NO: 1 вариабельная часть тяжелой цепи: SEQ ID NO: 2 легкая цепь: SEQ ID NO: 17 тяжелая цепь: SEQ ID NO: 18.

Антитело согласно B) является более предпочтительным. Тяжелая цепь предусматривает аминокислотную замену K324A.

Предпочтительными антителами в соответствии с настоящим изобретением являются гуманизированные формы моноклональных антител мыши, которые продуцируются линией клеток гибридомы Aβ 6-1-6 (№ в депозитарии DSM ACC 2924), которая описана в WO 2010/009987.

Последовательности легкой и тяжелой цепей для антител по настоящему изобретению могут варьироваться. Иммуноглобулины могут иметь две пары комплексов легкая цепь/тяжелая цепь, по меньшей мере одну цепь, содержащую одну или несколько мышиных участков, определяющих комплементарность (CDR), функционально соединенных с сегментами каркасного участка человека.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, где аминокислотной последовательностью каждой легкой цепи является SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательностью каждой тяжелой цепи является SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

Более предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, где аминокислотной последовательностью каждой легкой цепи является SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательностью каждой тяжелой цепи является SEQ ID NO: 19.

Наиболее предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, где аминокислотной последовательностью каждой легкой цепи является SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательностью каждой тяжелой цепи является SEQ ID NO: 18.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела по настоящему изобретению, содержащие CDR тяжелой и легкой цепей, как изложено в данном изобретении.

Человеческий каркасный участок антител по настоящему изобретению определяют путем сравнения аминокислотной последовательности каркасного или вариабельного участка CDR-предоставляющего иммуноглобулина, не являющегося человеческим, с соответствующими последовательностями в коллекции последовательностей, содержащей вариабельные участки иммуноглобулина человека. Выбирают последовательность с высоким процентом идентичных аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вариабельная часть легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит, по сути состоит из или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

Gacgtggtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccttggacagccggcctccatctcctgcaagtcaagtcagagcctcct

gcactccgacggcaagacctacttgaactggttccagcagaggccaggccagtctccaaggcgcctgacctatctggtgtctaagctg

gactctggggtcccagacagattcagcggcagtgggtcaggcactgacttcacactgaagatcagcagggtggaggctgaggatgtc

ggagtctactactgcgtgcaaggtacacacttcccattcacgttcggcggagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO: 9).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вариабельная часть тяжелой цепи, имеющая аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит, по сути состоит из или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

caggtgcagctcgtgcagtctggggctgaggtggtgaagccaggtgcctcagtgaaggtctcctgcaaggcatctggttactcattcac

tggtcacaccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactcatcaatccttccgatggtgttactaggt

acaaccagaagttccagggcagagtcaccatcaccagggacacgtccacgaccaccgttcacatggagctgaccagcctgacatctg

aggacacggccacctactactgtacgagagaggcgaaacgggagtgggacgagacttactggggccagggaaccctggtcaccgt

ctcctca (SEQ ID NO: 10).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения участки CDR легкой цепи антитела по настоящему изобретению кодируются молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими последовательности нуклеиновой кислоты:

CDR1 V_L: tcaagtcagagcctcctgcactccgacggcaagacctacttgaac (SEQ ID NO: 11);

CDR2 V_L: ctggtgtctaagctggactct (SEQ ID NO: 12) и

CDR3 V_L: gtgcaaggtacacacttccca (SEQ ID NO: 13).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения участки CDR тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению кодируются молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими последовательности нуклеиновой кислоты:

CDR1 V_H: ggttactcattcactggtcacaccatgaac (SEQ ID NO: 14);

CDR2 V_H: ctcatcaatccttccgatggtgttactaggtacaaccagaagttcc

Agggc (SEQ ID NO: 15) и

CDR3 V_H: gaggcgaaacgggagtgggacgagacttac (SEQ ID NO: 16).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения легкая цепь кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

Gacgtggtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccttggacagccggcctccatctcctgcaagtcaagtcagagcctcct

gcactccgacggcaagacctacttgaactggttccagcagaggccaggccagtctccaaggcgcctgacctatctggtgtctaagctg

gactctggggtcccagacagattcagcggcagtgggtcaggcactgacttcacactgaagatcagcagggtggaggctgaggatgtc

ggagtctactactgcgtgcaaggtacacacttcccattcacgttcggcggagggaccaaggtggaaatcaaaaggaccgtggccgca

ccctctgtgttcatcttccccccagcgacgagcagctgaagagcggcactgcatctgtcgtgtgtctgctgaacaacttctacccaagg

gaggcgaaagtgcagtggaaggtagacaacgccttgcaatccggcaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaagact

caacctacagcctgagcagtactttgaccctgtctaaggccgattacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtaacccaccagg

gactgagctctcccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc (SEQ ID NO: 20).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

caggtgcagctcgtgcagtctggggctgaggtggtgaagccaggtgcctcagtgaaggtctcctgcaaggcatctggttactcattcac

tggtcacaccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactcatcaatccttccgatggtgttactaggt

acaaccagaagttccagggcagagtcaccatcaccagggacacgtccacgaccaccgttcacatggagctgaccagcctgacatctg

aggacacggccacctactactgtacgagagaggcgaaacgggagtgggacgagacttactggggccagggaaccctggtcaccgt

ctcctcagccagcactaagggcccgagcgtgttccccctcgcccctagcagtaagagcaccagcggtggcacggcggcacttggct

gcttggttaaggactacttcccagagcccgtgaccgtgtcctggaactctggggcacttaccagtggcgtgcacaccttccccgctgtac

tgcagagcagcggcttgtacagcttgtcttccgtcgtaacggtgcccagcagcagcttgggaacccagacctacatctgcaacgtaaac

cacaagccatccaacaccaaggtagacaaaaaggtcgaacccaagtcctgcgacaagacccacacctgtccaccctgtcctgcaccc

gagctcctgggaggtcccagcgttttcctgttccctccaaagccaaaggataccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcg

tggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgttgatggggtggaggtacacaatgccaagaccaaac

ctcgagaggagcaatacaacagcacctaccgagttgtgagcgtgcttaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtaca

agtgcgctgtgagcaacaaggctctgccggctcccatcgagaagaccatcagcaaggccaagggccagcccagggagccacaggt

ttacacgttgcccccctcaagggacgagttgaccaagaaccaggtttccctcacgtgccttgtgaagggcttctaccccagcgacatcg

ccgtggaatgggagagcaacgggcagcccgagaacaactacaagacgaccccccctgttctggacagcgacggctctttcttcctgt

attcaaagctcaccgtggacaaaagcaggtggcagcagggtaatgttctcctgcagcgtgatgcacgaggccctgcataaccacta

cacccaaaagagcttgagcctctcccccggtaag (SEQ ID NO: 21).

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

caggtgcagctcgtgcagtctggggctgaggtggtgaagccaggtgcctcagtgaaggtctcctgcaaggcatctggttactcattcac

tggtcacaccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactcatcaatccttccgatggtgttactaggt

acaaccagaagttccagggcagagtcaccatcaccagggacacgtccacgaccaccgttcacatggagctgaccagcctgacatctg

aggacacggccacctactactgtacgagagaggcgaaacgggagtgggacgagacttactggggccagggaaccctggtcaccgt

ctcctcagccagcactaagggcccgagcgtgttcccctcgcccctagcagtaagagcaccagcggtggcacggcggcacttggct

gcttggttaaggactacttcccagagcccgtgaccgtgtcctggaactctggggcacttaccagtggcgtgcacaccttccccgctgtac

tgcagagcagcggcttgtacagcttgtcttccgtcgtaacggtgcccagcagcagcttgggaacccagacctacatctgcaacgtaaac

cacaagccatccaacaccaaggtagacaaaaaggtcgaacccaagtcctgcgacaagacccacacctgtccaccctgtcctgcaccc

gagctcctgggaggtcccagcgttttcctgttccctccaaagccaaaggataccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcg

tggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgttgatggggtggaggtacacaatgccaagaccaaac

ctcgagaggagcaatacaacagcacctaccgagttgtgagcgtgcttaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtaca

agtgcaaggtgagcaacaaggctctgccggctcccatcgagaagaccatcagcaaggccaagggccagcccagggagccacagg

tttacacgttgcccccctcaagggacgagttgaccaagaaccaggtttccctcacgtgccttgtgaagggcttctaccccagcgacatcg

ccgtggaatgggagagcaacgggcagcccgagaacaactacaagacgaccccccctgttctggacagcgacggctctttcttcctgt

attcaaagctcaccgtggacaaaagcaggtggcagcagggtaatgttctcctgcagcgtgatgcacgaggccctgcataaccacta

cacccaaaagagcttgagcctctcccccggtaag (SEQ ID NO: 22).

Дополнительно в соответствии с настоящим изобретением предпочтительными являются антитела, которые кодируются комбинацией молекул нуклеиновой кислоты, содержащих, по сути состоящих из или состоящих из:

C) вариабельная часть легкой цепи: SEQ ID NO: 9 вариабельная часть тяжелой цепи: SEQ ID NO: 10 легкая цепь: SEQ ID NO: 20 тяжелая цепь: SEQ ID NO: 22;

D) вариабельная часть легкой цепи: SEQ ID NO: 9 вариабельная часть тяжелой цепи: SEQ ID NO: 10 легкая цепь: SEQ ID NO: 20 тяжелая цепь: SEQ ID NO: 21.

Комбинация D) является наиболее предпочтительной поскольку она кодирует гуманизированное и деиммунизированное антитело, которое предусматривает аминокислотную замену K324A в тяжелой цепи.

Вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты могут быть интегрированы в векторы экспрессии, хорошо известные в данной области. Трансфекция этих векторов экспрессии в подходящем хозяине, выбор хозяина, а также экспрессия, сбор и очистка легких цепей, тяжелых цепей, димеров легкой/тяжелой цепи или интактных антител, связывающих фрагментов или других форм иммуноглобулина являются процедурами, хорошо известными в данной области.

Специалист в данной области может выбрать вектор на основе желаемых свойств, например для получения вектора в конкретной клетке, такой как клетка млекопитающего или бактериальная клетка.

Любой из множества индуцируемых промоторов или энхансеров может быть включен в состав век-

тора для экспрессии антитела по настоящему изобретению или нуклеиновой кислоты, которую можно регулировать. Такие индуцируемые системы включают, например, тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen & Bizard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992); Gossen et al., Science, 268:17664769 (1995); Clontech, Palo Alto, Calif.); промотор гена металлотионеина, индуцируемый тяжелыми металлами; стероидный гормон насекомых, чувствительный к экдизону или родственным стероидам, таким как муристерон (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996); Yao et al., Nature, 366:476-479 (1993); Invitrogen, Carlsbad, Calif.); вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), индуцируемый стероидами, такими как глюкокортикоид и эстроген (Lee et al., Nature, 294:228-232 (1981); и промоторы гена белка теплового шока, индуцируемые температурными изменениями; промотор гена нейрон-специфической энолазы крысы (Forss-Petter, et al., Neuron 5; 197-197 (1990)); промотор гена β-актина человека (Ray, et al., Genes and Development (1991) 5:2265-2273); промотор гена цепи человеческого тромбоцитарного фактора роста B (PDGF-B) (Sasahara, et al., Cell (1991) 64:217-227); промотор гена натриевого канала крысы (Maue, et al., Neuron (1990) 4:223-231); промотор гена медь-цинк супероксиддисмутазы человека (Ceballos-Picot, et al., Brain Res. (1991) 552:198-214) и промоторы для представителей семейства регуляторных генов домена POU млекопитающих (Xi et al., (1989) Nature 340:35-42).

Регуляторные элементы, включая промоторы или энхансеры, могут быть конститутивными или регулируемыми в зависимости от характера регуляции. Регуляторные последовательности или регуляторные элементы функционально связывают с одной из последовательностей молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, так что физическая и функциональная связь между последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты и регуляторной последовательностью обеспечивает возможность транскрибирования последовательности молекулы нуклеиновой кислоты. Векторы, применимые для экспрессии в эукариотических клетках, могут включать в себя, например регуляторные элементы, в том числе промотор CAG, ранний промотор SV40, промотор цитомегаловируса (CMV), стероид-индуцибельный промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), Pgtf, промотор вируса мышиного лейкоза Молони (MMLV), промотор thy-1 и им подобные.

При необходимости вектор может содержать селектируемый маркер. Используемый в данном изобретении термин "селектируемый маркер" относится к генетическому элементу, который обеспечивает селектируемый фенотип клетке, в которую введен селектируемый маркер. Селектируемый маркер обычно представляет собой ген, чей генный продукт обеспечивает устойчивость к средству, которое ингибирует рост клеток или уничтожает клетку. В конструкциях ДНК по настоящему изобретению могут быть использованы различные селектируемые маркеры, включая, например, гены Neo, Hyg, hisD, Gpt и Ble, как описано, например, в Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)) и патенте США № 5981830. Лекарственные средства, применимые для отбора на наличие селектируемого маркера, включают, например, G418 для Neo, гигромицин для Hyg, гистидинол для hisD, ксантин для Gpt и блеомицин для Ble (см. Ausubel et al., supra, (1999); патент США № 5981830). Конструкции ДНК по настоящему изобретению могут включать в себя положительный селектируемый маркер, отрицательный селектируемый маркер или и первый, и второй (см., например, патент США № 5981830).

Для экспрессии рекомбинантного белка также можно использовать различные системы культивирования клеток млекопитающих. Примеры систем экспрессии млекопитающих включают линии COS-7 фибробластов почки обезьяны, описанные Gluzman, Cell, 23: 175 (1981). Другие линии клеток, способные экспрессировать совместимый вектор, включают, например, линии клеток C127, 3T3, CHO, HeLa и BHK. Векторы экспрессии млекопитающих обычно включают в себя точку начала репликации, подходящие промотор и энхансер, а также любые необходимые сайты связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, сайты донора и акцептора сплайсинга, последовательности терминации транскрипции и 5'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. Последовательности ДНК, полученные из сайтов сплайсинга и полиаденилирования SV40, можно использовать для обеспечения требуемых нетранскрибируемых генетических элементов.

Полипептиды можно извлечь и выделить из культур рекомбинантных клеток с помощью способов, которые включают осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилапатите и хроматографию на лектине. Выделение можно упростить, если полипептид экспрессируется на поверхности клеток, но это не является обязательным условием. Также может быть желательным выделение продуктов расщепления, которые расщепляются после экспрессии более длинной формы полипептида. Стадии повторного сворачивания белка, известные в данной области, можно при необходимости использовать для получения полноценной конформации зрелого белка. Для конечных стадий очистки можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC).

Последовательности ДНК константного участка человека можно выделить в соответствии с хорошо известными процедурами из множества клеток человека.

Настоящее изобретение относится, в частности, к антителам, которые характеризуются тем, что они

связываются с Aβ-пептидами N3pE с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые характеризуются тем, что они связываются с Aβ-пептидами N3pE или их иммунологически активными фрагментами с высокой аффинностью. Указанная высокая аффинность в контексте настоящего изобретения означает аффинность со значением K_D 10^{-5} М, 10^{-6} М или 10^{-7} М или больше, предпочтительно значение K_D 10^{-8} М или больше, и даже более предпочтительно значение K_D 10^{-9} М-10^{-12} М. Как следствие, антитела по настоящему изобретению связываются с мономерным Aβ N3pE с более высокой аффинностью, чем уже известные антитела.

Предпочтительно связывающий эпитоп для антител по настоящему изобретению при связывании Aβ N3pE представляет собой эпитоп, который несет пироглутамат на N-конце. Более предпочтительно связывающий эпитоп для антитела по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из

pEFRHDSGYEVHHQKLV (SEQ ID NO: 23),

pEFRHDSGYEVHHQKL (SEQ ID NO: 24),

pEFRHDSGYEVHHQK (SEQ ID NO: 25),

pEFRHDSGYEVHHQ (SEQ ID NO: 26),

pEFRHDSGYEVHH (SEQ ID NO: 27),

pEFRHDSGYEVH (SEQ ID NO: 28),

pEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 29),

pEFRHDSGYE (SEQ ID NO: 30),

pEFRHDSGY (SEQ ID NO: 31),

pEFRHDSG (SEQ ID NO: 32),

pEFRHDS (SEQ ID NO: 33),

pEFRHD (SEQ ID NO: 34),

pEFRH (SEQ ID NO: 35) и

pEFR (SEQ ID NO: 36).

Наиболее предпочтительно антитела по настоящему изобретению не связываются со связывающими эпитопами, которые не несут пироглутамат на N-конце.

Еще более предпочтительно, чтобы при связывании с вышеупомянутыми и впоследствии упоминаемыми связывающими эпитопами, антитела по настоящему изобретению всегда связывались с последовательностями или частями последовательностей, которые содержат пироглутамат на N-конце. Антитела по настоящему изобретению не связываются с последовательностями или частями последовательностей, которые не содержат пироглутамат на N-конце.

Кроме того, антитело по настоящему изобретению может также связываться с вариантом Aβ N3pE.

В контексте настоящего изобретения вариант Aβ N3pE представляет собой, в частности,

pE-$A\beta_{3-38}$,

pE-$A\beta_{3-40}$,

pE-$A\beta_{3-42}$.

Дополнительными вариантами Aβ-пептидов N3pE являются все варианты Aβ N3pE, которые, как было показано, накапливаются в головном мозге вследствие болезни Альцгеймера или предшествуя болезни Альцгеймера. Они представляют собой пептиды pE-$A\beta_{3-x}$, где x определяется как целое число между 19 и 42, например в приведенном выше pE-$A\beta_{3-42}$ "42" будет являться целым числом для "x".

В контексте настоящего изобретения "функциональный вариант" антитела по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое сохраняет связывающие способности, в частности связывающие способности с высокой аффинностью к пептиду pE-$A\beta_{3-x}$. Обеспечение таких функциональных вариантов известно из уровня техники и охватывает вышеупомянутые возможности, которые были указаны в определении антител и их фрагментов.

В дополнительном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, как определено выше.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное и деиммунизированное антитело, которое содержит участки, определяющие комплементарность (CDR), из вышеуказанных антител. Предпочтительно антитело может быть меченым; допустимыми метками являются такие метки, которые указаны выше, и, в частности, все, которые известны специалистам в области диагностического применения антител.

В другом варианте осуществления антитела могут быть иммобилизованы на твердой фазе.

В другом варианте осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением и описанные в данном изобретении ранее или их фрагменты проявляют аффинность связывания с олигомером, волокном, фибриллой или филаментом Aβ N3pE, которая по меньшей мере в 2 раза, в частности по меньшей мере в 4 раза, в частности по меньшей мере в 10 раз, в частности по меньшей мере в 15 раз, более конкретно по меньшей мере в 20 раз, но главным образом по меньшей мере в 25 раз выше аффинности связывания с мономером Aβ N3pE.

В еще одном варианте осуществления предусмотрены антитела или их фрагменты, описанные в данном изобретении ранее, которые по сути связываются с агрегированным Aβ, в том числе с бляшками Aβ, которые содержат Aβ N3pE, у млекопитающего, в частности в головном мозге человека, но предпочтительно не проявляют какой-либо существенной перекрестной реактивности с белком-предшественником амилоида (APP).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены антитела или их фрагменты, описанные в данном изобретении ранее, причем эти антитела по сути связываются с олигомерным или полимерным амилоидом, который содержит Aβ N3pE, в частности с амилоидом β (Aβ) у млекопитающего, особенно в головном мозге человека, но предпочтительно не проявляют существенной перекрестной реактивности с белком-предшественником амилоида (APP).

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим указанные антитела, и к применению указанных композиций в лечении амилоидоза, особенно в лечении нейродегенеративного заболевания у млекопитающего, в частности у человека. Указанное нейродегенеративное заболевание, в частности, выбрано из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадической болезни Альцгеймера (SAD) или семейных форм деменции Альцгеймера (FAD), как например семейной британской деменции (FBD) и семейной датской деменции (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна. Предпочтительно указанное нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения и/или предупреждения состояний, характеризующихся образованием бляшек, содержащих Aβ N3pE, у млекопитающих, предпочтительно у людей, причем данный способ предусматривает введение, предпочтительно периферически, человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически или профилактически эффективного количества моноклонального антитела по настоящему изобретению или его иммунологически реакционноспособного фрагмента, причем данное антитело специфически связывается с эпитопом Aβ-пептида N3pE, который несет пироглутамат на N-конце.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ подавления образования амилоидных бляшек и выведения или удаления амилоидных бляшек у млекопитающих, предпочтительно у людей, причем данный способ предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в таком подавлении, эффективного количества антитела, которое связывается с Aβ N3pE в кровотоке, жидкостях или тканях организма, особенно в головном мозге, и более предпочтительно приводит к выведению Aβ N3pE из плазмы крови и головного мозга.

Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает способы регрессии снижения когнитивных способностей, улучшения когнитивных функций, лечения снижения когнитивных способностей и предупреждения снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна и клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезнь Альцгеймера, предусматривающие введение субъекту эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает применение антитела по настоящему изобретению для изготовления лекарственного препарата для лечения, предупреждения или регрессии легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезни Альцгеймера, или для регрессии снижения когнитивных способностей, улучшения когнитивных функций, для лечения снижения когнитивных способностей и предупреждения снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как на-

пример семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна и клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезнь Альцгеймера.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела, раскрытые в данном изобретении, для применения в предупреждении, лечении или регрессии легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезни Альцгеймера; для лечения, предупреждения или регрессии снижения когнитивных способностей, улучшения когнитивных функций, лечения снижения когнитивных способностей и предупреждения снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезни Альцгеймера; или подавления образования амилоидных бляшек или эффектов, обусловленных Aβ N3pE, у млекопитающих, предпочтительно у человека.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ сохранения или увеличения способности когнитивной памяти, но в особенности восстановления способности когнитивной памяти у млекопитающего, в частности у человека, страдающего нарушением памяти, путем введения животному, в частности млекопитающему или человеку, антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело в соответствии с настоящим изобретением и описываемое в данном изобретении выше.

Настоящее изобретение также предусматривает способы оценки ответа субъекта-человека на лечение с помощью антитела, которое связывает Aβ N3pE или его вариант, предусматривающие:

a) введение антитела по настоящему изобретению или его фрагмента субъекту и

b) измерение концентрации Aβ N3pE в биологическом образце, полученном от субъекта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения человека с помощью антитела, которое связывает Aβ N3pE или его вариант, предусматривающий:

a) введение первого количества антитела или его фрагмента субъекту;

b) измерение концентрации Aβ N3pE в биологическом образце, полученном от субъекта, в течение периода от 3 ч до двух недель после введения первой дозы;

c) при необходимости расчет второго количества антитела или его фрагмента, исходя из результата, полученного на стадии b), причем второе количество является таким же или отличается от первого количества, и

d) введение второго количества антитела или его фрагмента.

Настоящее изобретение также включает способ оценки у млекопитающего, предпочтительно субъекта-человека, эффективности антитела, которое связывается с Aβ N3pE, или его фрагмента, в отношении подавления или предупреждения образования обусловленной Aβ N3pE амилоидной бляшки, в отношении снижения нагрузки содержащих Aβ N3pE бляшек, в отношении снижения эффектов токсичного Aβ N3pE и его вариантов или в отношении лечения состояния или заболевания, ассоциированного с бляшками, содержащими Aβ N3pE, предусматривающий:

a) получение первого биологического образца от субъекта;

b) измерение исходной концентрации Aβ N3pE в первом образце;

c) введение антитела по настоящему изобретению или его фрагмента субъекту;

d) получение второго биологического образца от субъекта в течение периода от 3 ч до двух недель после введения антитела или его фрагмента и

e) измерение концентрации Aβ N3pE во втором биологическом образце; где эффективность связана с количеством Aβ N3pE, связавшимся с антителом в крови, и с концентрацией Aβ N3pE, в частности со снижением его концентрации, во втором биологическом образце по сравнению с первым биологическим образцом.

Биологический образец может представлять собой любой образец, например полученный от человека. В одном конкретном примере образец представляет собой образец ткани, образец жидкости организма или образец клеток. В одном варианте осуществления биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки крови, мочи, спинномозговой жидкости (CSF), плазмы крови, лимфы, слюны, пота, плевральной жидкости, синовиальной жидкости, слезной жидкости, желчи и секрета поджелудочной железы. В дополнительном варианте осуществления биологический образец представляет собой плазму крови. В предпочтительном варианте осуществления биологический образец представляет собой CSF.

Биологический образец можно получить от субъекта с помощью способа, хорошо известного специалисту в данной области. В частности, образец крови можно получить от субъекта и образец крови

можно разделить на сыворотку и плазму крови с помощью стандартных способов. Субъект, от которого получен биологический образец, предпочтительно представляет собой субъекта с подозрением на поражение заболеванием или состоянием, представляющим собой амилоидоз, предпочтительно болезнь Альцгеймера, с риском развития болезни Альцгеймера и/или с риском развития или наличием какой-либо другой формы деменции. В частности, образец получен от субъекта с подозрением на наличие легкого когнитивного нарушения (MCI) и/или у которого имеются ранние стадии болезни Альцгеймера.

Эффективность антител по настоящему изобретению в диагностике, предупреждении и/или лечении амилоидоза, как например легкое когнитивное нарушение, болезнь Альцгеймера, семейная британская деменция или семейная датская деменция и, например, нейродегенерация при синдроме Дауна, можно тестировать на существующих моделях болезни Альцгеймера у животных.

Подходящие модели болезни Альцгеймера у животных рассматриваются в McGowan et al. TRENDS in Genetics, Vol. 22, No. May 2006, pp 281-289, и выбраны из PDAPP, Tg2576, APP23, TgCRND8, $PSEN_{1M146V}$ или $PSEN_{1M146L}$, PSAPP, APP_{Dutch}, BRI-Aβ40 и BRI-Aβ42, JNPL3, Tau_{P301S}, Tau_{V337M}, Tau_{R406W}, rTg4510, H_{tau}, TAPP, 3×TgAD, описываемых ниже.

PDAPP: первая трансгенная модель мутантного APP с устойчивым бляшкообразованием. Мыши экспрессируют кДНК APP человека с мутацией Indiana (APP_{V717F}). Бляшкообразование начинается в 6-9 месяцев у гемизиготных мышей PDAPP. Имеет место потеря синапсов, но не наблюдается явной потери клеток или патологии NFT. Эта модель широко используется в стратегиях вакцинотерапии.

Tg2576: мыши экспрессируют мутантный APP_{SWE} под управлением промотора гена прионного белка хомяков. Бляшкообразование наблюдается с 9-месячного возраста. У этих мышей имеется когнитивный дефицит, но отсутствует потеря клеток или патология NFT. Эта модель является одной из наиболее широко используемых трансгенных моделей в области болезни Альцгеймера.

APP23: мыши экспрессируют мутантный APPswe под управлением промотора Thy1. Выраженный цереброваскулярный амилоид, амилоидные отложения наблюдаются с 6-месячного возраста, и некоторая потеря нейронов гиппокампа ассоциирована с образованием амилоидных бляшек.

TgCRND8: мыши экспрессируют несколько мутаций APP (шведская плюс Indiana). Когнитивный дефицит совпадает с быстрым развитием внеклеточных бляшек в возрасте ~ 3 месяцев. Когнитивный дефицит можно устранить с помощью вакцинотерапии против Aβ.

$PSEN_{1M146V}$ или $PSEN_{1M146L}$ (линии 6.2 и 8.9 соответственно): эти модели были первой демонстрацией in vivo того, что мутантный PSEN1 избирательно повышает Aβ42. Не наблюдается явного бляшкообразования.

PSAPP (Tg2576×$PSEN_{1M146L}$, PSEN1-A246E+APP_{SWE}): дигенные трансгенные мыши с добавлением мутантного трансгена PSEN1, который значительно ускоряет амилоидную патологию по сравнению с однократно трансгенными мышами с мутантным APP, демонстрируя, что повышение уровня Aβ42 под влиянием PSEN1 усиливает бляшкообразование.

APP_{Dutch}: мыши экспрессируют APP с голландской мутацией, которая вызывает наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом голландского типа у людей. У мышей с APP_{Dutch} развивается тяжелая конгофильная амилоидная ангиопатия. Добавление мутантного трансгена PSEN1 перераспределяет амилоидную патологию на паренхиму, указывая на разные роли Aβ40 и Aβ42 в сосудистой и паренхиматозной амилоидной патологии.

BRI-Aβ40 и BRI-Aβ42: мыши экспрессируют отдельные Aβ-изоформы без сверхэкспрессии APP. Только у мышей, экспрессирующих Aβ42, развиваются сенильные бляшки и CAA, тогда как у мышей BRI-AP40 бляшки не развиваются, указывая на то, что Aβ42 имеет важное значение для образования бляшек.

JNPL3: мыши экспрессируют MAPT 4R0N с мутацией P301L. Это первая трансгенная модель с выраженным образованием клубков и потерей клеток, демонстрирующая, что MAPT сам по себе может вызвать повреждение и потерю клеток. У мышей JNPL3 с возрастом развиваются двигательные нарушения вследствие тяжелой патологии и потери двигательных нейронов в спинном мозге.

Tau_{P301S}: трансгенные мыши, экспрессирующие самую короткую изоформу MAPT 4R с мутацией P301S. У гомозиготных мышей развивается тяжелый парапарез в возрасте 5-6 месяцев с распространенной нейрофибриллярной патологией в головном и спинном мозге и потерей нейронов в спинном мозге.

Tau_{V337M}: низкоуровневый синтез MAPT 4R с мутацией V337M (1/10 эндогенного MAPT) под управлением промотора гена тромбоцитарного фактора роста (PDGF). Развитие нейрофибриллярной патологии у этих мышей свидетельствует о том, что природа MAPT, а не абсолютная внутриклеточная концентрация MAPT вызывает патологию.

Tau_{R406W}: мыши, экспрессирующие 4R MAPT человека с мутацией R406W под контролем промотора CAMKII. У мышей развиваются включения MAPT в переднем мозге с возраста 18 месяцев и имеет место нарушенная ассоциативная память.

rTg4510: индуцируемые с использованием системы TET-off MAPT-трансгенные мыши. Аномальная патология MAPT возникает с возраста одного месяца. Мыши характеризуются прогрессирующей патологией NFT и тяжелой потерей клеток. Когнитивный дефицит выражен с 2,5-месячного возраста. От-

ключение трансгена улучшает когнитивные характеристики, но патология NT ухудшается.

H_{tau}: трансгенные мыши, экспрессирующие только человеческий геномный MAPT (нокаут мышиного MAPT). У мышей H_{tau} накапливается гиперфосфорилированный MAPT с 6 месяцев и развиваются тио-S-положительные NFT к моменту достижения 15 месяцев.

TAPP (Tg2576×JNPL3): усиленная патология MAPT переднего мозга у мышей TAPP по сравнению с JNPL3, свидетельствующая, что мутантный APP и/или Aβ может оказывать влияние на последующую патологию MAPT.

3×TgAD: тройная трансгенная модель, экспрессирующая мутантный APP_{SWE}, $MAPT_{P301L}$ на фоне "нокин" $PSEN_{1M146V}$ (PSNE1-KI). У мышей развиваются бляшки с 6 месяцев и патология MAPT с момента достижения 12-месячного возраста, подкрепляя гипотезу о том, что APP или Aβ могут непосредственно влиять на нейрофибриллярную патологию.

Кроме того, в WO 2009/034158 раскрываются модели на трансгенных животных, не являющихся человеком, в которых трансген кодирует по меньшей мере один бета-амилоидный (Aβ) пептид, выбранный из группы, состоящей из AβN3E-42, AβN3Q-42, AβN3E-40 и AβN3Q-40. Эти Aβ-пептиды представляют собой субстраты QC и QPCTL, что приводит к циклизации N-концевого глутамина (Q) или глутамата (N) в пироглутамат (pGlu). Таким образом, эти модели на трансгенных животных представляют собой модельную систему для исследования влияния pGlu-Aβ-пептидов на ход развития нейродегенерации.

Антитела к Aβ pN3pE также могут быть применимыми в диагностических анализах на Aβ pN3pE, например в выявлении его появления в конкретных клетках, тканях или сыворотке крови. Таким образом, антитела в соответствии с настоящим изобретением особенно полезны в диагностическом способе выявления амилоидоза, в частности нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейная форма деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна, предпочтительно болезни Альцгеймера.

Для применений в диагностике антитело, как правило, будет мечено выявляемым фрагментом. Доступны многочисленные метки, которые можно в целом сгруппировать в следующие категории:

(a) радиоактивные изотопы, такие как 35S, 14C, 125I, 3H и 131I. Антитела можно метить с помощью радиоактивных изотопов с использованием методик, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Gütigen et al., Ed., Wiley -Interscience. New York, New York. Pubs. (1991), и радиоактивность можно измерить с помощью подсчета сцинтилляции;

(b) доступны флуоресцентные метки, такие как хелаты редкоземельных элементов (хелаты европия) или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, лиссамин, фикоэритрин и техасский красный. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом с использованием методик, раскрытых, к примеру, выше в Current Protocols in Immunology. Флуоресценцию можно количественно определить с помощью флуориметра;

(c) доступны различные фермент-субстратные метки. Фермент обычно катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно измерить с использованием различных методик. Например, фермент может катализировать изменение цвета в субстрате, которое можно измерить спектрофотометрически. В качестве альтернативы фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методики количественной оценки изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат подвергается электронному возбуждению посредством химической реакции, а затем может испускать свет, который можно измерить (например, с использованием хемилюминометра), или выступать в качестве донора энергии для флуоресцентного акцептора. Примеры ферментативных меток включают люциферазы (например, люцифераза светлячков и люцифераза бактерий, патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, О-галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридные оксидазы (например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантиноксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и им подобные. Методики конъюгирования ферментов с антителами описаны в O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, в Methods in Enzym (ed Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166 (1981).

Примеры комбинаций фермент-субстрат включают, например:

(i) пероксидазу хрена (HRPO) с пероксидом водорода в качестве субстрата, где пероксид водорода окисляет предшественник красителя (например, ортофенилендиамин (OPD) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (TMB));

(ii) щелочную фосфатазу (AP) с пара-нитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата; и

(iii) β-D-галактозидазу (β-D-Gal) с хромогенным субстратом (например, п-нитрофенил-β-D-галактозидом) или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил-β-D-галактозидом.

Специалистам в данной области доступно множество других комбинаций фермент-субстрат.

Иногда метка опосредованно конъюгирована с антителом. Специалисту в данной области будут известны различные методики для достижения этого. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любую из трех широких категорий меток, упомянутых выше, можно конъюгировать с авидином или наоборот Биотин избирательно связывается с авидином и таким образом метку можно конъюгировать с антителом таким опосредованным образом. В качестве альтернативы для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело конъюгируют с небольшим гаптеном (например, дигоксином), а один из различных типов меток, упомянутых выше, конъюгируют с антителом к гаптену (например, антителом к дигоксину) Таким образом можно достичь опосредованной конъюгации метки с антителом.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в любом известном способе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации. Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press. Inc., 1987)

Анализы конкурентного связывания основаны на способности меченого стандарта конкурировать с тестируемым образцом за связывание с ограниченным количеством антител. Количество Aβ N3pE в тестируемом образце обратно пропорционально количеству стандарта, которое связывается с антителами. Чтобы упростить определение количества связанного стандарта, антитела обычно являются нерастворимыми до или после конкуренции, поэтому стандарт и аналит, которые связаны с антителами, можно беспрепятственно отделить от стандарта и аналита, которые остаются несвязанными.

Сэндвич-анализы включают применение двух антител, каждое из которых способно связываться с отдельной иммуногенной частью или эпитопом белка, подлежащего обнаружению. В сэндвич-анализе анализируемое вещество тестируемого образца связывается первым антителом, которое иммобилизовано на твердой подложке, а после этого второе антитело связывается с аналитом, образуя таким образом нерастворимый комплекс из трех частей. Второе антитело само по себе может быть мечено выявляемым фрагментом (прямой сэндвич-анализ) или может быть измерено с использованием антитела к иммуноглобулину, которое мечено выявляемым фрагментом (непрямой сэндвич-анализ). Например, один предпочтительный тип сэндвич-анализа представляет собой анализ ELISA, в случае которого выявляемый фрагмент является ферментом.

Для иммуногистохимии образец ткани может быть свежим или замороженным, или может быть залит в парафин и зафиксирован, например консервантом, таким как формалин.

Настоящее изобретение также относится к композиции, которая содержит определенные выше антитела, где указанная композиция представляет собой композицию для применения в диагностике, в частности в диагностике нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера; в частности, путем выявления Aβ N3pE или его вариантов в биологическом образце.

Диагностические наборы.

В целях удобства антитело по настоящему изобретению может быть предоставлено в наборе, то есть упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями для проведения диагностического анализа. Когда антитело мечено ферментом, набор будет включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который обеспечивает выявляемый хромофор или флуорофор). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и им подобные. Относительные количества различных реагентов могут широко варьироваться для обеспечения в растворе концентраций реагентов, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть представлены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая вспомогательные вещества, которые при растворении дают раствор реагента с соответствующей концентрацией.

Диагностический набор по настоящему изобретению может содержать дополнительное биологически активное вещество, описываемое ниже. Особенно предпочтительным для применения в диагностическом наборе, как указано дополнительно, дополнительным биологически активным веществом является ингибитор глутаминилциклазы.

Диагностический набор по настоящему изобретению особенно полезен в выявлении и диагностике ассоциированных с амилоидом заболеваний и состояний, в частности нейродегенеративных заболеваний, выбранных из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера.

Настоящее изобретение также относится к антителу по настоящему изобретению или к композиции, содержащей антитело, все из которых определены выше, для применения в способе диагностики in

vitro. В частности, данный способ диагностики направлен на проведение диагностики нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера; в частности путем выявления Aβ N3pE или его вариантов в биологическом образце.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к следующему способу:

способ диагностики in vitro или in situ для проведения диагностики ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния, предпочтительно болезни Альцгеймера, предусматривающий следующие стадии:

приведение в контакт антитела в соответствии с настоящим изобретением с образцом, предпочтительно выбранным из образца, представляющего собой сыворотку крови, ликвор или CSF, наиболее предпочтительно образцом сыворотки крови; или с определенной частью тела или областью тела субъекта с подозрением поражения указанным состоянием или заболеванием, и

выявление связывания антитела с Aβ N3pE из образца.

Более конкретно настоящее изобретение относится к способу диагностики ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния, предпочтительно болезни Альцгеймера, предусматривающему выявление иммуноспецифического связывания антитела по настоящему изобретению или его иммунологически активного фрагмента с Aβ N3pE в образце или in situ, включающий стадии:

(a) приведения образца, или конкретной части тела или области тела с подозрением на содержание амилоидного белка в контакт с антителом по настоящему изобретению или его фрагментом;

(b) предоставления возможности антителу и/или его функциональной части связаться с Aβ N3pE с образованием иммунологического комплекса;

(c) выявление образования иммунологического комплекса и

(d) установление корреляции присутствия или отсутствия иммунологического комплекса с присутствием или отсутствием Aβ N3pE в образце или конкретной части или области тела.

Также включен способ определения степени нагрузки амилоидогенными бляшками тканей и/или жидкостей организма, предусматривающий:

(a) получение репрезентативного образца исследуемой ткани и/или жидкости организма;

(b) тестирование указанного образцы в отношении присутствия амилоидного белка с помощью антитела в соответствии с настоящим изобретением или химерного антитела или его фрагмента;

(c) определение количества антитела, связанного с белком; и

(d) расчет нагрузки бляшками ткани и/или жидкостей организма.

В частности, настоящее изобретение относится к способу определения степени нагрузки амилоидогенными бляшками ткани и/или жидкостей организма, где образование иммунологического комплекса на стадии c) определяют таким образом, что присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием амилоидного белка, в частности Aβ N3pE.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело в соответствии с настоящим изобретением или химерное антитело или его фрагмент, и как описано в данном изобретении ранее, включая любое функционально эквивалентное антитело или любое его производное или функциональные части, в частности к композиции, которая представляет собой фармацевтическую композицию, необязательно дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления по настоящему изобретению указанная композиция содержит антитело по настоящему изобретению в терапевтически эффективном количестве.

Дополнительно предусматривается в настоящем изобретении смесь, содержащая антитело по настоящему изобретению или химерное антитело или его фрагмент, и как описано в данном изобретении ранее, включая любое функционально эквивалентное антитело или любое его производное или функциональные части, в терапевтически эффективном количестве и необязательно дополнительное биологически активное вещество, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

В частности, настоящее изобретение относится к смеси, в которой дополнительное биологически активное вещество представляет собой соединение, используемое в лечении амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с амилоидным или амилоидоподобным белком, таким как Aβ N3pE, вовлеченным в нейродегенеративные заболевания, выбранные из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как например спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как например семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения другое биологически активное вещест-

во или соединение также может представлять собой терапевтическое средство, которое можно использовать для лечения амилоидоза, вызванного Aβ N3pE, или можно использовать в лечении других неврологических нарушений.

Другое биологически активное вещество или соединение может проявлять свое биологическое действие по тому же или аналогичному механизму, как и антитело в соответствии с настоящим изобретением, или путем неродственного механизма действия, или с помощью нескольких родственных и/или не родственных механизмов действия.

Как правило, другое биологически активное соединение может включать в себя усилители нейронной передачи, психотерапевтические лекарственные средства, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, блокаторы кальциевых каналов, биогенные амины, бензодиазепиновые транквилизаторы, усилители синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонисты постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов, ингибиторы моноаминоксидазы A или B, антагонисты N-метил-D-аспартатных рецепторов глутамата, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, антиоксиданты и антагонисты серотонинергических рецепторов.

Более конкретно настоящее изобретение относится к смеси, содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений, эффективных в отношении оксидативного стресса, антиапоптотических соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, таких как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновой кислоты (3 APS), 1,3-пропандисульфоната (1,3PDS), активаторов α-секретазы, ингибиторов β- и γ-секретазы, тау-белков, нейромедиатора, средств, разрушающих β-складчатые слои, аттрактантов клеточных компонентов, обеспечивающих выведение/снижение количества бета-амилоида, ингибиторов бета-амилоида с N-концевым усечением, включая пироглутаматный вариант бета-амилоида 3-42, таких как ингибиторы глутаминилциклазы, противовоспалительных молекул или ингибиторов холинэстеразы (ChEI), таких как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, M1-агонистов и других лекарственных средств, включая любые модифицирующие амилоид или тау лекарственные средства и пищевые добавки, и пищевые добавки вместе с антителом в соответствии с настоящим изобретением и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

Настоящее изобретение дополнительно относится к смеси, в которой соединение представляет собой ингибитор холинэстеразы (ChEI), в частности к смеси, в которой соединение представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из такрина, ривастигмина, донепезила, галантамина, ниацина и мемантина.

В дополнительном варианте осуществления смеси в соответствии с настоящим изобретением могут содержать ниацин или мемантин вместе с антителом в соответствии с настоящим изобретением и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

В дополнительном варианте осуществления смеси в соответствии с настоящим изобретением могут содержать ингибитор глутаминилциклазы вместе с антителом в соответствии с настоящим изобретением и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

Предпочтительные ингибиторы глутаминилциклазы описаны в WO 2005/075436, WO 2008/055945, WO 2008/055947, WO 2008/055950, WO 2008/065141, WO 2008/110523, WO 2008/128981, WO 2008/128982, WO 2008/128983, WO 2008/128984, WO 2008/128985, WO 2008/128986, WO 2008/128987, WO 2010/026212, WO 2011/131748, WO 2011/029920, WO 2011/107530, WO 2011/110613, WO 2012/123563 и WO 2014/140279, раскрытие которых включено в данное изобретение посредством ссылки.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены смеси, которые содержат "атипичные антипсихотические средства", такие как например, клозапин, зипразидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, для лечения положительных и отрицательных психотических симптомов, включая галлюцинации, бредовые иллюзии, расстройства мышления (проявляющиеся выраженной непоследовательностью, соскальзыванием, тангенциальностью) и причудливое или дезорганизованное поведение, а также ангедонию, аффективное уплощение, апатию и социальное отчуждение, совместно с антителом, в частности моноклональным антителом в соответствии с настоящим изобретением, но особенно химерным антителом или его фрагментом, или антителом или его фрагментом в соответствии с настоящим изобретением, и как описано в данном изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения композиции и смеси в соответствии с настоящим изобретением, и как описано в данном изобретении выше, содержат антитело по настоящему изобретению и биологически активное вещество соответственно в терапевтически эффективном количестве.

Другие соединения, которые могут быть соответствующим образом использованы в смесях в комбинации с антителом в соответствии с настоящим изобретением, описаны в WO2008/065141 (см., в частности, страницы 37/38), включая ингибиторы PEP (pp. 43/44), LiCl, ингибиторы дипептидиламинопепти-

даз, предпочтительно ингибиторы DP IV- или DP IV-подобных ферментов (см. стр. 48/49); ингибиторы ацетилхолинэстеразы (ACE) (см. стр. 47), усилители PIMT, ингибиторы бета-секретаз (см. стр. 41), ингибиторы гамма-секретаз (см. стр. 41/42), ингибиторы нейтральной эндопептидазы, ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (PDE-4) (см. стр. 42/43), ингибиторы TNF-альфа, антагонисты мускариновых M1-рецепторов (см. стр. 46), антагонисты NMDA-рецепторов (см. стр. 47/48), ингибиторы сигма-1-рецепторов, антагонисты гистаминовых H3-рецепторов (см. стр. 43), иммуномодулирующие средства, иммуносупрессивные средства или средство, выбранное из группы, состоящей из антегрена (натализумаба), Neurelan (фампридин-SR), кампата (алемтузумаба), IR 208, NBI 5788/MSP 771 (типлимотида), паклитаксела, Anergix.MS (AG 284), SH636, Differin (CD 271, адапалена), BAY 361677 (интерлейкина-4), ингибиторов матриксной металлопротеиназы (например, BB 76163), интерферона-тау (трофобластина) и SAIK-MS; антитела к бета-амилоиду (см. стр. 44), ингибиторы цистеиновой протеазы (см. стр. 44); антагонисты MCP-1 (см. стр. 44/45), ингибиторы отложения амилоидного белка (см. 42) и ингибиторы синтеза бета-амилоида (см. стр. 42), при этом указанный документ включен в данное изобретение посредством ссылки.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к смеси, содержащей антитело в соответствии с настоящим изобретением или химерное антитело или его фрагмент, и как описано в данном изобретении ранее, и/или биологически активное вещество в терапевтически эффективном количестве.

Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными вспомогательными средствами и вспомогательными веществами в соответствии с обычными методиками, такими как раскрытые в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2005.

Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные вспомогательные средства и вспомогательные вещества должны быть подходящими для выбранного антитела по настоящему изобретению и выбранного способа введения. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия значительного отрицательного воздействия на требуемые биологические свойства выбранного антитела или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем значительное воздействие (относительное ингибирование 10% или меньше, относительное ингибирование 5% или меньше и т.д.) на связывание антигена).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные протеиногенные аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения. Выбранный уровень доз будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность используемых конкретных композиций по настоящему изобретению или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого антитела, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и анамнез подвергаемого лечению пациента и аналогичные факторы, хорошо известные в области медицины.

Фармацевтическую композицию можно вводить с помощью любого подходящего пути и способа. Подходящие пути введения антитела по настоящему изобретению in vivo и in vitro хорошо известны в данной области и могут быть выбраны специалистами в данной области.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят парентерально.

Используемые в данном изобретении фразы "парентеральное введение" и "вводимые парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно осуществляемый путем инъекции, и включают эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутричерепную, интраторакальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят с помощью внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства для придания изотоничности, антиоксиданты и средства, замедляющие абсорбцию, и им подобные, которые физиологически совместимы с антителом по настоящему изобретению.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевти-

ческих композициях по настоящему изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и им подобные) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую смолу и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармации.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления инъекционных стерильных растворов или дисперсии. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Кроме тех из любых обычных сред или средств, которые несовместимы с антителом, их применение предполагается в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для нанесения покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и им подобные; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и им подобные; и (3) металлохелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, ортофосфорная кислота и им подобные.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать средства для придания изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия в композициях.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или более вспомогательных средств, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы, диспергирующие средства, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Антитела по настоящему изобретению можно получать с носителями, которые будут защищать антитело от быстрого высвобождения, как например состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, простые полиортоэфиры и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы получения таких составов обычно известны специалистам в данной области. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть составлены для обеспечения правильного распределения in vivo. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления инъекционных стерильных растворов или дисперсии. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Кроме тех из любых обычных сред или средств, которые несовместимы с антителом, их применение предполагается в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции для инъекций обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть водный или неводный растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как глицерин, маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительной абсорбции инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина. Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения антитела в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, например перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения антитела в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые обеспе-

чивают получение порошка активного ингредиента плюс любой необходимый дополнительный ингредиент из ранее подвергнутого стерилизующему фильтрованию раствора.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения антитела в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения антитела в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента плюс любой необходимый дополнительный ингредиент из ранее подвергнутого стерилизующему фильтрованию раствора.

Схемы приема в вышеуказанных способах лечения и применениях корректируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Парентеральные композиции можно составить в виде единичной дозированной формы для облегчения введения и постоянства дозировки. Используемая в данном изобретении единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит заранее определенное количество антитела, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Технические требования для единичных дозированных форм по настоящему изобретению продиктованы и непосредственно зависят от (a) уникальных характеристик антитела и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничений, присущих области составления такого антитела для лечения чувствительности у индивидуумов.

Эффективные дозы и схемы приема для антител по настоящему изобретению зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области. Иллюстративный неограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению составляет приблизительно 0,1-10 мг/кг массы тела, как, например, приблизительно 0,1-5 мг/кг массы тела, например приблизительно 0,1-2 мг/кг массы тела, как, например, приблизительно 0,1-1 мг/кг массы тела, например приблизительно 0,15, приблизительно 0,2, приблизительно 0,5, приблизительно 1, приблизительно 1,5 или приблизительно 2 мг/кг массы тела.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать вводить дозы антитела к АβрЕ3, используемого в фармацевтической композиции, при уровнях ниже, чем требуется для достижения требуемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до достижения требуемого эффекта. В целом подходящей суточной дозой композиции по настоящему изобретению будет такое количество антитела, которое является наиболее низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше. Введение, например, может быть внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным, и, к примеру, вводимым поблизости от целевого сайта. При необходимости эффективную суточную дозу фармацевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более частей дозы, вводимых отдельно через соответствующие интервалы в течение дня, необязательно в единичных дозированных формах. Хотя антитело по настоящему изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно вводить антитело в виде фармацевтической композиции, как описано выше.

Примеры

1. Подход с гуманизацией для создания N3pE-Aβ-специфичных антител.

Гуманизированные и деиммунизированные антитела в соответствии с настоящим изобретением являются гуманизированными и деиммунизированными формами моноклональных антител мыши, которые продуцируются линией клеток гибридомы Aβ 6-1-6 (№ в депозитарии DSM ACC 2924), которые описаны в WO 2010/009987. Гуманизация проводилась, как описано в WO 2017/009459. Рабочий пример 1, раскрытый на стр. 58-60 в WO 2017/009459, включен тем самым в данное изобретение посредством ссылки.

2. Выделение РНК и синтез кДНК.

В качестве источника для константных последовательностей выделяли РНК человеческих В-клеток путем лизиса 500 мкл цельной крови с 5 мл 1× раствора для лизиса FACS (Becton Dickinson) в течение 10 минут при комнатной температуре. Лизат центрифугировали при 300 g в течение 5 мин; осадок промывали два раза с использованием PBS, а затем растворяли в 350 мкл буфера RA1 Nucleo Spin ® RNA II (Macherey-Nagel) и добавляли 3,5 мкл 0,5 М TCEP (SIGMA). РНК выделяли согласно инструкциям изготовителей. Сначала 10 мкл РНК инкубировали с 1 мкл 0,5 мкг/мкл праймера OligodT (Invitrogen) и 1 мкл 10 мМ dNTP в течение 5 мин. при 65°С. Затем 4 мкл × буфера для синтеза первой нити (Invitrogen), 2 мкл

100 мМ DTT и 0,5 мкл обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen) добавляли к 20 мкл и смесь инкубировали в течение 5 мин при 25°C, 50 мин при 50°C и 15 мин при 70°C. С помощью ПЦР с парами праймеров, показанными в табл. 2, можно амплифицировать синтезированную кДНК константного участка легкой и тяжелой цепи.

Таблица 2

Праймер для клонирования константного участка

SEQ ID NO	Название	Последовательность
43	hkappa5'	ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
44	hkappa3'	CTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC
45	hIgG1Hc5'1	AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
46	hIgG1Hc3'	TCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG

Для амплификации продукта ПНР легкой цепи клона № 6 использовали следующие прямой и обратный праймеры:

RT_chim_humKl6f: CAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTG (SEQ ID NO: 47);

RT_chim_humKl6r: GTACCTTGCACGCAGTAATAAAC (SEQ ID NO: 48).

Для амплификации эталонного гена использовали праймер для мышиного HPRT.

Для проведения амплификации 7,5 мкл Sybergreen (Firma), 1 мкл прямого праймера (25 пмоль/мкл), 1 мкл обратного праймера (25 пмоль/мкл), 5,5 мкл бидистиллированной H_2O и 1 мкл кДНК использовали в термоциклере.

3. Экспрессия рекомбинантного антитела в клетках CHO путем раздельного клонирования LC и HC в две различные плазмиды экспрессии.

Последовательности легкой и тяжелой цепи антител раздельно клонировали в два разных вектора экспрессии млекопитающих, pCDNA3.1 и HC-pOptiVEC соответственно. Чтобы идентифицировать оптимальную комбинацию векторов для экспрессии рекомбинантного антитела в культуре клеток CHO, использовали различные комбинации плазмид для проведения временных экспрессии в адгезивных клетках CHO. На второй стадии было исследовано, насколько влияет разные соотношение ДНК в плазмиде LC и HC на уровень экспрессии. При трансфекции 3 мкг LC-pCDNA3.1 и 1 мкг HC-pOptiVEC обнаружили повышенный уровень экспрессии.

Для дальнейшей экспрессии антитела в адгезивных клетках CHO использовали комбинацию из плазмид, предусматривающую LC-pCDNA3.1 и 1 мкг HC-pOptiVEC, причем соотношение плазмидной ДНК составляло LC 3:1 HC.

Клетки Freestyle™ CHO в суспензионной культуре использовали в следующих трансфекциях для культивирования большего количества временно экспрессирующих клеток, которые генерируют рекомбинантные антитела. Сначала было проверено, может ли избыток плазмиды LC улучшать экспрессию антитела, как в случае адгезивных клеток. Как и в случае адгезивных клеток CHO, использовали соотношение плазмидной ДНК LC и HC 1:1 и 3:1. Анализ с помощью вестерн-блоттинга показал, что избыток плазмиды LC увеличивает экспрессию антитела, как в случае адгезивных клеток CHO. При измерении жизнеспособности клеток было очевидно, что жизнеспособность клеток снижается до приблизительно 50% трансфицированных клеток через 6 дней. После шестого дня не отмечали дальнейшего повышения уровня антител в надосадочной жидкости. Соответственно, надосадочные жидкости культур собирали в день шесть в случае последующих трансфекций.

Для исследования того, насколько эффективно продуцируемые антитела переносятся в клеточную надосадочную жидкость, образец клеточного лизата подвергали SDS-PAGE и проводили анализ с помощью вестерн-блоттинга. GAPDH, цитоплазматический конститутивный белок, использовали для эталонной загрузки сопоставимых количеств белка клеточного лизата в SDS-гель. В клеточном лизате клеток CHO, экспрессирующих антитело, имела место четкая полоса соответствующая 120 кДа, мигрирующая при таком же размере, как и выявленная в клеточной надосадочной жидкости.

4. Очистка рекомбинантного антитела с помощью хроматографии на белке G.

Клон № 6 антитела очищали для исследования антигенсвязывающего свойства белка по сравнению с исходным мышиным антителом. Соответственно, получали 300 мл надосадочной жидкости с экспрессированным химерным и гуманизированным антителом и очищали с помощью хроматографии на белке G. Поскольку количество экспрессированного антитела было очень низким, выход составлял менее 0,1 мкг/мл, а в общей сложного 25 мкг очищенного белка. Элюированное антитело концентрировали до приблизительно 200 мкг/мл, и 2 мкг белка наносили на SDS-PAGE с последующим окрашиванием посредством кумасси синего.

5. Создание стабильной линии клеток, продуцирующих гуманизированное антитело.

Исходное антитело для гуманизированного антитела по настоящему изобретению является вариантом клона № 6, раскрытого в WO 2017/009459, который имеет вариабельную область легкой цепи с ами-

нокислотной последовательностью:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK

LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIK (SEQ

ID NO: 1), которая раскрыта под SEQ ID NO: 14 в WO 2017/009459;

и который имеет вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSN

GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ

GTLVTVSS (SEQ ID NO: 49), которая раскрыта под SEQ ID NO: 27 в WO 2017/009459.

Два клона, C06.08 и C06.09, исходного варианта клона № 6 выбирали для создания стабильной линии клеток. Для создания C06.08- и C06.09-продуцирующих клеток DG44 яичника китайского хомяка (CHO) сначала создали плазмиды экспрессии, содержащие последовательности генов тяжелой и легкой цепи, для обоих антител. Плазмиды линеаризировали, очищали посредством осаждения с помощью изопропанола, повторно растворяли в 10 мМ Трисе с pH 8,0 и применяли в трансфекциях следующим образом: 1×10^6 клеток CHO-DG44 суспендировали в 100 мкл раствора Nucleofector V (Lonza) и смешивали с 10 мкг линеаризованной векторной ДНК. Суспензию подвергали воздействию импульсов с использованием электропоратора Amaxa Nucleofector II (Lonza). Затем добавляли 500 мкл среды CD CHO (Invitrogen) и пулы трансфицированных клеток культивировали в течение 24 ч.

Для создания стабильных мини-пулов (MP) пулы трансфицированных клеток объединяли через один день после трансфекции, переносили либо в среду CD CHO и высевали по 2000 клеток/лунка и 4000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты соответственно, либо переносили в среду CD CHO с 2,5 нМ метотрексата (MTX) и высевали по 4000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты. После периода культивирования продолжительностью 21 (C06.08) или 27 (C06.09) дней 20 MP переносили в 24-луночные планшеты. В день 22 или день 28 после трансфекции MP переносили в 12-луночные планшеты, и MP распространяли в 6-луночные планшеты в день 34 или день 48. В день 34 (C06.08) или 48 (C06.09) пулы переносили в селективную среду с 30 нМ MTX для индуцирования процесса амплификации и определяли титры экспрессии антитела по результатам измерения с помощью Octet.

Результаты.

Таблица 2

Анализ стабильных мини пулов C06.08

День 1	День 21	Дни 34-72
	Отобранные MP	MTX-амплификация
2000 клеток/лунка	№ 1-10	Клеточный рост отсутствует; крайне низкое продуцирование антитела или его отсутствие
4000 клеток/лунка	№ 11-15	
4000 клеток/лунка и 2,5 нМ MTX	№ 15-20	

Таблица 3

Анализ стабильных мини пулов C06.09

День 1	День 27	Дни 48-52
	Отобранные MP	MTX-амплификация
2000 клеток/лунка	№ 1-10	Клеточный рост отсутствует; крайне низкое продуцирование антитела или его отсутствие
4000 клеток/лунка	№ 11-15	
4000 клеток/лунка и 2,5 нМ MTX	№ 15-20	

Как показано в табл. 2 и 3, все MP проявляли слабый клеточный рост, крайне низкое или невыявляемое продуцирование антител (<10 пг/клетка/день), и множество MP не перенесли MTX-

амплификацию. Повторение экспериментов трансфекции с новым набором реагентов приводит к аналогичным результатам, тогда как трансфекция контрольными векторами приводила к нормальным уровням экспрессии белка. Эти результаты указывают на то что геномингегрированные белки C06.08 и C06.09 могут оказывать присущие токсические эффекты на клетки CHO-DG44, например такие белки могут вызывать гибель клеток в связи с сверхэкспрессией неправильно уложенных белков C06.08 и C06.09 в ядрах клеток. Требовались дополнительные модификации первичной последовательности C06.08 и C06.09, которые исправляют неправильную укладку белков и устраняют индуцирование гибели клеток CHO-DG44.

Модификации PBD-C06 для улучшения укладки и экспрессии белка.

Анализ in silico аминокислотных последовательностей C06 выявил несколько отрезков аминокислот (точек) в каркасных областях тяжелой цепи, которые, как предполагалось, отрицательно влияли на укладку белка. Для проверки можно ли в этих точках осуществить замену на альтернативные аминокислоты, которые улучшают экспрессию белка, четыре отдельные мутации тяжелой цепи (K12V, S14P, N55D и F64V) сначала синтезировали и тестировали по отдельности во временных трансфекциях в отношении экспрессии белка вместе с легкой цепью под SEQ ID NO: 17. С помощью исследования связывания мишени выявляли, что модификация F64V предупреждает связывание антитела. Во второй серии экспериментов, комбинации каждой мутации объединяли в пары и триплеты в отдельные гены тяжелой цепи и тестировали в комбинации с легкой цепью под SEQ ID NO: 17 в отношении экспрессии и исследований связывания мишени (фиг. 1 и 2).

Результаты.

Комбинация мутаций K12V, S14P и N55D приводила к лучшим титрам временной экспрессии C06 и оптимальным свойствам связывания мишени (фиг. 1 и 2), и соответствующий клон, содержащий все три данные мутации, выбирали для исследований устойчивой трансфекции CHO-DG44.

Устойчивая экспрессия гуманизированного антитела в клетках CHO-DG44.

Исходные клетки CHO-DG44 изначально получали у Gibco, Life Technologies (FreedomTM DG44 Kit), в настоящее время управляемой Thermo Fisher Scientific. Клеточная линия CHO является дефицитной по DHFR, и на нее предоставлена документация о соответствии требованиям действующей редакции правил GMP.

Трансфекция клеток CHO-DG44 векторами, экспрессирующими гуманизированное антитело, содержащее легкую цепь под SEQ ID NO: 1 и тяжелую цепь под SEQ ID NO: 2 (которая содержит мутации K12V, S14P и N55D), приводила к увеличенному в несколько раз числу клонов CHO-DG44 по сравнению с предыдущими попытками трансфекции (см. выше). Кроме того, после воздействия с помощью MTX идентифицировали несколько клонов с высокими титрами экспрессии целевого антитела, показывая, что мутации K12V, S14P и N55D улучшали сворачивание антитела и экспрессию после устойчивой интеграции в геном CHO-DG44. Длительную устойчивую экспрессию подтверждали в условиях подпитки в течение длительных периодов культивирования, подтверждая, что выбранные изменения (K12V, S14P и N55D) в тяжелой цепи исходного клона № 6 способствовали правильной укладке и экспрессии в клетках CHO-DG44.

Дополнительные устойчивые клеточные линии получали после дальнейшей оптимизации вектора и электропорации. Исходные трансфектанты перед амплификацией генов характеризовались высокими уровнями экспрессии антитела вскоре после выделения и высевания в 0.5 мл культуры в 24-луночный планшет (фиг. 3). Титры продуцирования в день 7 дополнительно увеличивались после первого воздействия с помощью MTX (фиг. 4), указывая на то, что эти клоны, в частности с 17, будут являться намного более эффективным продуцентом.

Краткое описание

Четыре мутации тяжелой цепи тестировали по отдельности, чтобы определить, приведут ли они к увеличению экспрессии антитела во временно трансфицированных клетках HEK293. Три из этих мутаций в значительной степени повышали экспрессию антитела, тогда как четвертая понижала экспрессию. Комбинации отдельных мутаций также проверяли в парах, а также тройную мутацию, все из которых хорошо экспрессировались и подвергались очистке с помощью хроматографии на белке A. После анализа Biacore установили, что комбинация из четырех мутаций снижала связывание, тогда как комбинация конкретных мутаций K12V, S14P и N55D характеризовалась хорошей экспрессией и имела оптимальные свойства связывания. Каких-либо изменений в последовательностях легких цепей для обеспечения высокой экспрессии не требовалось.

Исследования проводили на стабильно трансфицированных клетках DG44 CHO, и более высокие уровни экспрессии антитела получали после исходного отбора и последующей амплификации генов, индуцированной посредством ступенчатого повышения количества метотрексата (MTX). Дополнительно устанавливали, что более высокие уровни экспрессии антитела не препятствуют хорошему клеточному росту. В целом, процедура трансфекции приводила к идентификации нескольких новых кандидатов для изготовления в соответствии с CMC.

5. Измерение поверхностного плазменного резонанса для анализа связывания гуманизированного и деиммунизированного антитела с мономерными Aβ-пептидами.

Измерение поверхностного плазмонного резонанса применяли для исследования эффективности связывания антитела, которое содержит вариабельную часть легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и вариабельную часть тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2. Для предупреждения возникновения эффектов массопереноса и авидности в ходе измерения использовали следующую процедуру.

Сначала поликлональное а-человеческое антитело связывали с SPR-чипом, который затем загружали антителом до такой степени, чтобы единица ответа составила более 1000.

Измерения кинетики проводили при различных концентрациях (от 5 до 1000 нМ) Аβ-пептида. Графики измеренных рядов концентраций показаны в виде графика наложения с использованием сенсограмм, скорректированных по сенсограмме, измеряющей подвижный буфер, выровненных в момент введения и с поправкой на исходные данные до нуля перед введением. Результаты оценивают согласно простой модели взаимодействия 1:1 (аппроксимация с использованием уравнения Ленгмюра), которая преобразовывает константы скорости k_{off} и k_{on}.

Кажущиеся кинетические константы в соответствии с аппроксимацией с использованием уравнения Ленгмюра 1:1 приведены в табл. 4. Из-за того, что антитело связано с поверхностью чипа нековалентно, небольшие количества молекул антитела вымывались при измерении. Поэтому значения R_{max} аппроксимировали локально для каждой отдельной сенсограммы.

Таблица 4

Статистические данные аппроксимации с использованием уравнения Ленгмюра кинетических параметров клона № 6 гуманизированного и деиммунизированного антитела

Аβ-пептид	**K_D**	**k_a, ($c^{-1}M^{-1}$)**	**k_d, (c^{-1})**	**R_{max}**	**RI**	**Хи^2**
Аβ (pE3-18)	8,22 нМ	4,79 x 10^5	3,94 x 10^{-3}	Глобальное (43,9 RU)	локальное	0,462
Аβ (3-18)	1,21 мкм	3,09 x 10^3	3,74 x 10^{-3}	Глобальное (40,8 RU)	локальное	0,243
Аβ (1-18)	23,1 мкм	173	3,99 x 10^{-3}	Глобальное (57,4 RU)	локальное	0,400
Аβ (4-18)	28,3 мкм	-	-	48,9 RU	-	0,0815

Связывание с Аβ(pE3-18).

Качественная и визуальная оценка записанных сенсограмм показывает хорошую форму для фазы ассоциации, а также для фазы диссоциации. Кроме того, наблюдалось повышение зависимого от концентрации ответного сигнала и увеличение начального наклона для фазы ассоциации. Максимальные сигналы SPR составляли ~44 RU, что находилось в пределах оптимального диапазона измерений кинетических параметров связывания без или с незначительными эффектами массопереноса. Смещения исходного уровня не наблюдали, следовательно данные оценивали с применением модели связывания Ленгмюра 1:1, получая свойства связывания данного взаимодействия и качество аппроксимации (табл. 4).

Связывание с Аβ(3-18).

Качественная и визуальная оценка записанных сенсограмм показывает хорошую форму для фазы ассоциации, а также для фазы диссоциации. Кроме того, наблюдалось повышение зависимого от концентрации ответного сигнала и увеличение начального наклона для фазы ассоциации. Максимальные сигналы SPR составляли ~44 RU, что находилось в пределах оптимального диапазона измерений кинетических параметров связывания без или с незначительными эффектами массопереноса. Смещения исходного уровня не наблюдали, следовательно данные оценивали с применением модели связывания Ленгмюра 1:1, получая свойства связывания данного взаимодействия и качество аппроксимации (табл. 4).

Связывание с Аβ(1-18).

Качественная и визуальная оценка записанных сенсограмм показывает типичную форму для слабого связывание, соответствующую применяемым концентрациям пептида. Наблюдали слабое смещение исходного уровня; следовательно, данные аппроксимировали с применением уравнения связывания Ленгмюра 1:1 с моделью смещения исходного уровня. Оценка данных кинетических параметров (табл. 4) приводила к определению константы диссоциации, составляющей 23,1 мкм, которая превышала наивысшую измеренную концентрацию Аβ(1-18). Кроме того, рассчитанное значение R_{max} в значительной степени превышало значения ответа для наивысшей концентрации. Оба факта указывают на то, что полученные свойства связывания определенно находятся в диапазоне K_D>10 мкм.

Связывание с Аβ(4-18).

Качественная и визуальная оценка записанных сенсограмм показывает типичную форму для очень слабого связывания, соответствующую применяемым концентрациям пептида. Из-за очень быстрой ассоциации и диссоциации данные не могли быть оценены кинетически, следовательно применяли статическую модель. Оценка ответных сигналов в статической модели (табл. 4) приводила к определению константы диссоциации, составляющей 28,3 мкм, которая превышала наивысшую измеренную концентрацию Аβ(4-18). Кроме того, рассчитанное значение R_{max} в значительной степени превышало значения

ответа для наивысшей концентрации. Оба факта указывают на то, что полученные свойства связывания определенно должны находится в диапазоне K_D>10 мкм.

6. Связывание с Аβ-фибриллами и Аβ-олигомерами.

Фибриллы пептидов Аβ(1-42) получали согласно стандартным протоколам при pH 8,7 и 37°C. После полной фибрилляция структуры аспирировали в 60 мкл, разбавляли в 140 мкл подвижного буфера и загружали на сенсорный чип с применением захватывающих антител со скоростью потока 1 мкл/мин. Затем, систему промывали пока не получали устойчивый исходный уровень. Приблизительно 100 RU фибрилл Аβ(1-42) захватывали на сенсорном чипе.

Олигомеры пептидов Аβ(1-42) получали в соответствии с протоколом ACUMEN в среде Ham F12 в течение ночи при 4°C и отделяли от агрегированного Аβ с помощью центрифугирования. После этого олигомеры аспирировали в 20 мкл, разбавляли в 60 мкл подвижного буфера и загружали на сенсорный чип с применением захватывающих антител со скоростью потока 1 мкл/мин. Затем систему промывали в течение ночи с 100 мкл/мин, получая устойчивый исходный уровень. Приблизительно 300 RU олигомеров Аβ(1-42) захватывали на сенсорном чипе.

Для фибрилл пептидов Аβ(1-42) после получения устойчивого исходного уровня анализ взаимодействия проводили посредством 11 последовательных введений (10, 30, 90, 270, 810 пМ, 2,43, 7,29, 21,87, 65,61, 196,83 и 590,49 нМ) клона № 6 исходного антитела, раскрытого в WO 2017/009459, и клона № 6 гуманизированного и деиммунизированного антитела по настоящему изобретению с 30 мкл/мин, временем контакта 480 с и временем диссоциации 1200 с. Полученные сенсограммы оценивали с применением пяти последовательных концентраций (начиная с первого введения, показывающего связывание) и кинетической модели одного цикла с глобальной аппроксимацией R_{max}, и смещением исходного уровня, и локальными аппроксимациями объемного эффекта каждого введения.

Для олигомеров пептидов Аβ(1-42) после получения устойчивого исходного уровня анализ взаимодействия проводили посредством 11 последовательных введений (10, 30, 90, 270, 810 пМ, 2,43, 7,29, 21,87, 65,61, 196,83 и 590,49 нМ) клона № 6 исходного антитела, раскрытого в WO 2017/009459, и клона № 6 гуманизированного и деиммунизированного антитела по настоящему изобретению с 30 мкл/мин, временем контакта 480 с и временем диссоциации 3600 с. Полученные сенсограммы оценивали с применением пяти последовательных концентраций (начиная с первого введения, показывающего связывание) и кинетической модели одного цикла с глобальной аппроксимацией R_{max}, и смещением исходного уровня, и локальными аппроксимациями объемного эффекта каждого введения.

Результаты.

Таблица 5

Связывание с фибриллами пептидов Аβ(1-42)

Антитело	**K_D**	**ka** $M^{-1}c^{-1}$	**kd** 10^{-5} c^{-1}	**Rmax**	**Хи^2**
A	65,9 пМ	$9{,}9 \cdot 10^5$	6,53·	26 RU	0,336
B	1,67 нМ	$5{,}97 \cdot 10^4$	9,99·	19,2 RU	0,602

Таблица 6

Связывание с олигомерами пептидов Аβ(1-42)

Антитело	**K_D**	**ka** $M^{-1}c^{-1}$	**kd** 10^{-4} c^{-1}	**Rmax**	**Хи^2**
A	7,61 нМ	$1{,}86 \cdot 10^4$	1,42·	442 RU	6,31
B	269 нМ	868	2,33·	216 RU	0,284

В табл. 5 и 6:

A представляет собой клон № 6 исходного антитела, раскрытого в WO 2017/009459, с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO: 49; и

B представляет собой клон № 6 гуманизированного и деиммунизированного антитела по настоящему изобретению с вариабельной областью легкой цепи под SEQ ID NO: 1 и вариабельной областью тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2.

Как видно из этих результатов, настоящее изобретение предусматривает антитела и их фрагменты, где антитела показывают повышенную селективность в отношении олигомеров и/или фибрилл Аβ-пептидов. Антитела по настоящему изобретению демонстрируют многократно, как например в 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 или более чем 250 раз, более низкую величину константы связывания (значение K_D) в отношении связывания с олигомерами и/или фибриллами Аβ (1-42), чем у сопоставимых моноклональных антител, известных из предыдущего уровня техники, в частности по сравнению с исходным антителом, раскрытым в WO 2017/009459. Соответственно, антитела по настоящему изобретению, которые получали для селективного связывания с Аβ-пептидами N3pE, являются более специфичными в отношении Аβ-пептидов N3pE и показывают пониженную перекрестную реактивность в отношении Аβ-пептидов, отличных от Аβ N3pE.

7. Связывание с рецепторами Fc-гамма.

Сравнивали связывание двух антител, которые либо содержали тяжелую цепь под SEQ ID NO: 19,

либо ее мутантный вариант K324A (SEQ ID NO: 18), с различными рецепторами Fc-гамма (CD16A, CD32A, CD32B и CD64).

Мутант K324A получали с помощью сайт-направленного мутагенеза. Связывание измеряли в биологическом анализе на основе FACS в клетках яичника китайского хомячка (CHO), стабильно экспрессирующих человеческие CD16A, CD32A, CD32B или CD64. Оба антитела инкубировали с каждой линией клеток при 7 разных концентрациях в течение одного часа с последующей промывкой. Связанные с рецептором H6 или H67 выявляли с помощью конъюгированного с флуорохромом антитела к Fab'. Связывающую способность измеряли с помощью FACS, а Kd и B_{max} рассчитывали с использованием нелинейной регрессии.

Результаты: оба антитела показали сопоставимое связывание со всеми рецепторами. 8. Связывание с C1q.

Сравнивали связывание двух антител, которые либо содержали тяжелую цепь под SEQ ID NO: 19, либо ее мутантный вариант K324A (SEQ ID NO: 18), с C1q, чтобы лучше охарактеризовать эффекторные функции антител.

Тестировали ряд аналитических форматов связывания антител с C1q, в том числе

a) прямое связывание двух антител с планшетом, а затем связывание с C1q в растворе; и

b) планшеты, покрытые стрептавидином, сначала инкубировали с биотинилированным pE-Aβ-пептидом, связывали с антителами, а затем с C1q.

Таким образом, формат a) дал наилучшие результаты. Процедура обобщена ниже.

Планшет для ELISA покрывали антителом, содержащим тяжелую цепь под SEQ ID NO: 19, его мутантный вариант K324A (SEQ ID NO: 18) и контроль K324A, который не связывает C1q, при 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 и 0 мкг/мл в трех повторностях и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет трижды промывали 1× PBS, а затем блокировали с использованием 1% BSA в 1× PBS при 50 мкл/лунка. C1q (Sigma, кат. № C1740) добавляли в каждую лунку при 2 мкг/мл в блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшет промывали трижды с использованием 200 мкл 1× PBS. Anti-C1q-HRP (Thermo, кат. № PA1-84324) добавляли в планшет для выявления связывания при разведении 1:250 в блокирующем буфере (50 мкл/лунка) в течение 1 ч. Планшет снова промывали трижды с использованием 200 мкл 1× PBS. 50 мкл TMB (Invitrogen, кат. № 002023) добавляли в каждую лунку для визуализации взаимодействия (Invitrogen, кат. № 002023) в течение 2 мин. 50 мкл стоп-раствора ((1M серная кислота) добавляли в каждую лунку перед считыванием оптической плотности при 450 нм.

Результаты. Антитело, которое содержало тяжелую цепь дикого типа под SEQ ID NO: 19, связывалось с C1q. Его мутантный вариант K324A (содержащий тяжелую цепь под SEQ ID NO: 18) не связывался с C1q.

9. Иммуногистохимия.

С использованием IHC антиген Aβ N3pE можно определить в срезах ткани головного мозга. Поэтому антитела по настоящему изобретению использовали для выявления Aβ N3pE.

Для IHC-срезов можно использовать ткани головного мозга человека из гиппокампа и лобной доли пациентов с AD, и кроме того, срезы ткани головного мозга из гиппокампа существующих моделей животных для болезни Альцгеймера, как описано в данном изобретении. Эти мышиные модели демонстрируют повышенные уровни Aβ в головном мозге, после которых происходит развитие нейритных бляшек. Срезы тканей заливали в парафин и делали серийные срезы. Срезы окрашивали гематоксилином для окрашивания ядер клеток, а затем иммунологически окрашивали антителами к Aβ N3pE по настоящему изобретению. Подготовку и окрашивание срезов ткани проводили в соответствии со стандартной методикой.

10. Обработка мышей с болезнью Альцгеймера in vivo.

В данном исследовании использовали в общей сложности 62 самцов мышей. До начала иммунизации четырех мышей существующей мышиной модели болезни Альцгеймера (сред. 5,6 мес. ±0,45) умерщвляли в качестве контролей на исходном уровне для оценки церебральной нагрузки Aβ-бляшками в начале лечения. Оставшихся мышей разделяли на четыре группы и они получали следующую обработку: 250 мкл стерильного PBS (n=12; сред. 5,89 мес. ±0,13), 200 мкг антитела по настоящему изобретению. Группе сопоставимых по возрасту и полу однопометных животных Wt вводили 250 мкл PBS (n=12; сред. 5,80 мес. ±0,12), и она служила поведенческим контролем. Мышей обрабатывали с использованием общего объема 250 мкл (антитело или PBS) с помощью внутрибрюшинной инъекции в течение 28 недель.

Эвтаназия и подготовка тканей.

Мышей подвергали эвтаназии, перфузировали и собирали плазму крови в возрасте 6 месяцев (исходный уровень) или в 13 месяцев. Головной мозг извлекали и разделяли сагиттально. Гиппокамп, кору и мозжечок препарировали из одного полушария и замораживали для биохимического анализа. Другое полушарие фиксировали в 4% параформальдегиде (Electron Microscopy Sciences) в течение 24 ч при 4°C, подвергали криопротекции в ступенчатом градиенте растворов сахарозы при 4°C и заливали OCT (Tissue Tek).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, где вариабельная часть легкой цепи указанного антитела состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1),

и где вариабельная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 2),

причем указанное антитело связывается с несущим пироглутамат на N-конце эпитопом в пироглутаматном варианте бета-амилоидного пептида (Aβ N3pE).

2. Антитело по п.1, содержащее участки CDR:

CDR1 V_L: SSQSLLYSDGKTYLN (SEQ ID NO: 3);

CDR2 V_L: LVSKLDS (SEQ ID NO: 4) и

CDR3 V_L: VQGTHFP (SEQ ID NO: 5)

в легкой цепи.

3. Антитело по п.1, содержащее участки CDR:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 V_H: LINPSDGVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 7) и

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 8)

в тяжелой цепи.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где легкая цепь содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLTYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 17).

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где тяжелая цепь содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18).

6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где тяжелая цепь содержит, по сути состоит из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPSD GVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTATYYCTREAKREWDETYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19).

7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело специфически связывается с эпитопом, выбранным из группы, состоящей из

pEFRHDSGYEVHHQKLV (SEQ ID NO: 23),

pEFRHDSGYEVHHQKL (SEQ ID NO: 24),

pEFRHDSGYEVHHQK (SEQ ID NO: 25),

pEFRHDSGYEVHHQ (SEQ ID NO: 26),

pEFRHDSGYEVHH (SEQ ID NO: 27),

pEFRHDSGYEVH (SEQ ID NO: 28),

pEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 29),

pEFRHDSGYE (SEQ ID NO: 30),

pEFRHDSGY (SEQ ID NO: 31),

pEFRHDSG (SEQ ID NO: 32),

pEFRHDS (SEQ ID NO: 33),

pEFRHD (SEQ ID NO: 34),

pEFRH (SEQ ID NO: 35) и

pEFR (SEQ ID NO: 36).

8. Антитело по любому из пп.1-6, где указанное антитело согласно изобретению связывается с вариантом Aβ N3pE, при этом вариант Aβ N3pE определен как pE-$A\beta_{3-X}$, при этом x определен как целое число от 19 до 42.

9. Антитело по п.8, где вариант Aβ N3pE выбран из

pE-$A\beta_{3-38}$,

pE-$A\beta_{3-40}$,

pE-$A\beta_{3-42}$.

10. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело не связывается с эпитопами, которые не несут пироглутамат на N-конце.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и дополнительное биологически активное вещество, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где указанное дополнительное биологически активное вещество выбрано из усилителей нейронной передачи, психотерапевтических лекарственных средств, ингибиторов ацетилхолинэстеразы, блокаторов кальциевых каналов, биогенных аминов, бензодиазепиновых транквилизаторов, усилителей синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонистов постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов, ингибиторов моноаминоксидазы A или B, антагонистов N-метил-D-аспартатных рецепторов глутамата, нестероидных противовоспалительных лекарственных средств, антиоксидантов и антагонистов серотонинергических рецепторов.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанное дополнительное биологически активное вещество выбрано из группы, состоящей из соединений, эффективных в отношении оксидативного стресса, антиапоптотических соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, 3-амино-1-пропансульфоновой кислоты (3 APS), 1,3-пропандисульфоната (1,3PDS), активаторов α-секретазы, ингибиторов β- и γ-секретазы, тау-белков, нейромедиатора, средств, разрушающих β-складчатые слои, аттрактантов клеточных компонентов, обеспечивающих выведение/снижение количества бета-амилоида, ингибиторов бета-амилоида с N-концевым усечением, противовоспалительных молекул или ингибиторов холинэстеразы (ChEI), M1-агонистов и других лекарственных средств.

14. Применение антитела по любому из пп.1-10 для диагностики амилоидоза.

15. Применение по п.14, где амилоидоз включает нейродегенеративное заболевание, выбранное из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерацию при синдроме Дауна и клиническую или доклиническую стадию церебральной амилоидной ангиопатии; и/или состояние, выбранное из продромальной AD, AD легкой степени, AD средней степени и

AD тяжелой степени.

16. Применение антитела по любому из пп.1-10 для лечения амилоидоза.

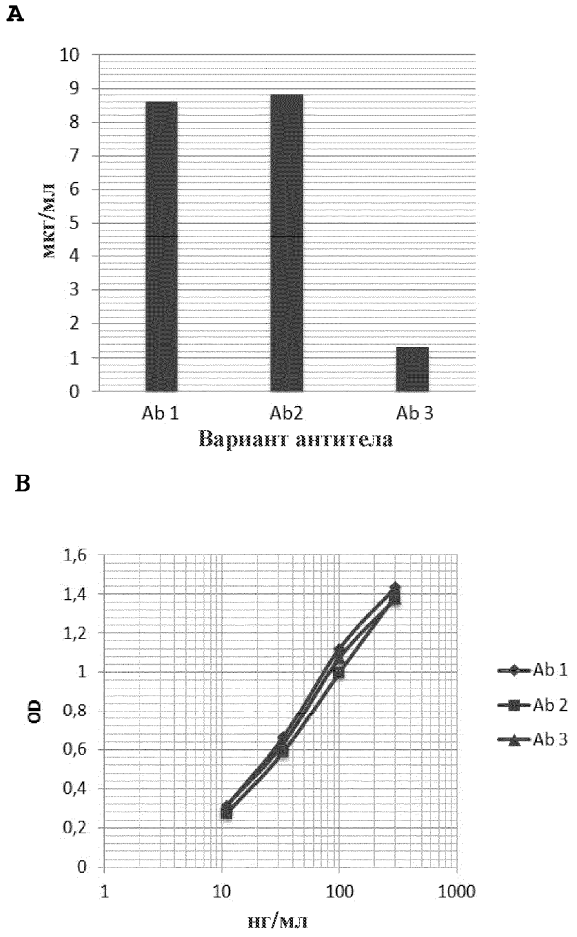
17. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.11-13 для лечения амилоидоза.

18. Применение по п.16 или 17, где амилоидоз включает нейродегенеративное заболевание, выбранное из группы, состоящей из легкого когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии; и/или состояние, выбранное из продромальной AD, AD легкой степени, AD средней степени и AD тяжелой степени, и/или снижение когнитивных способностей у пациента с диагностированным состоянием, выбранным из клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии.

19. Применение по п.18, где введение указанного антитела или указанной фармацевтической композиции приводит к регрессии снижения когнитивных способностей, улучшению когнитивных функций или предупреждению снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом легкое когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна и клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии и/или состояние, выбранное из продромальной AD, AD легкой степени, AD средней степени и AD тяжелой степени; или

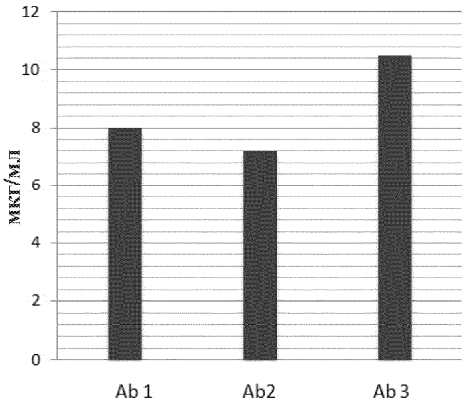
где введение указанного антитела или указанной фармацевтической композиции приводит к выведению или удалению Aβ N3pE из бляшек или других биологических комплексов; или

где введение указанного антитела или указанной фармацевтической композиции приводит к уменьшению нагрузки бляшками и/или удалению цельных бляшек из пораженной ткани, такой как ткань головного мозга.

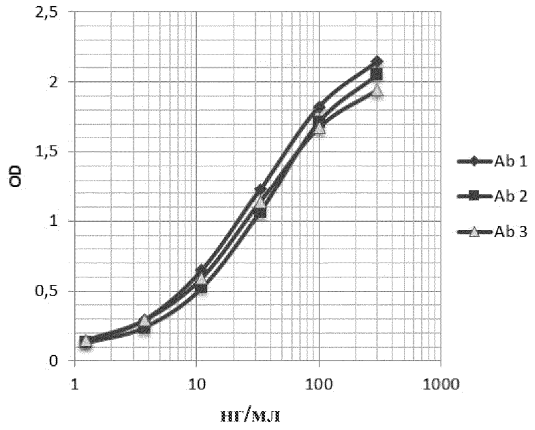


Фиг. 1

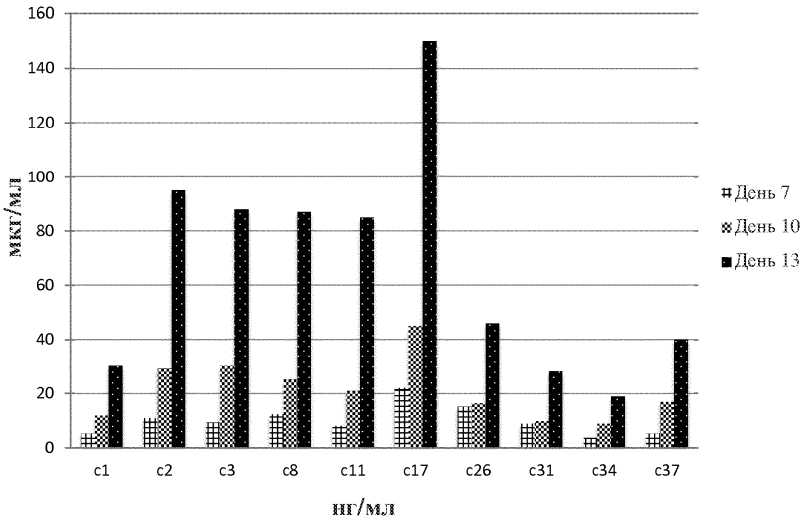
A


12
10
8
6
4
2
0
мкг/мл
Ab 1
Ab2
Ab 3

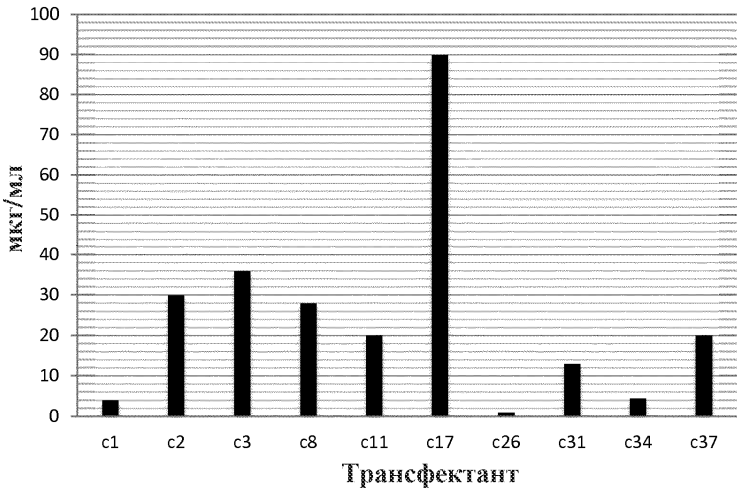
B


2,5
2
1,5
1
0,5
0
OD
1
10
100
1000
нг/мл
Ab 1
Ab 2
Ab 3

Фиг. 2


160
140
120
100
80
60
40
20
0
мкг/мл
c1
c2
c3
c8
c11
c17
c26
c31
c34
c37
нг/мл
День 7
День 10
День 13

Фиг. 3



Фиг. 4

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2