



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.22

(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.26

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С БЕЛКОМ ASM, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(31) 10-2021-0068628; 10-2022-0057049

(72) Изобретатель:

(32) 2021.05.27; 2022.05.10

Хон Сын Бом, Бэ Джэ Сун, Джин Хи
Кён (KR)

(33) KR

(86) PCT/KR2022/007485

(74) Представитель:

(87) WO 2022/250470 2022.12.01

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ИСУ АБКCИС КО., ЛТД.; КЁНПУК
НЭШНЛ ЮНИВЕРСИТИ
ИНДАСТРИ-АКАДЕМИК
КООПЕРЕЙШН ФАУНДЕЙШН (KR)

(57) Предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком кислой сфингомиелиназы (ASM), причём указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с белком ASM с высокой аффинностью связывания, значительно ингибируют активность белка ASM, присутствующего в клеточной мембране, и демонстрируют эффекты улучшения когнитивной памяти, ингибирования активности белка ASM, ингибирования накопления β-амилоида и тау-белка и ингибирования развития нейровоспаления даже без проявления токсичности в моделях болезни Альцгеймера у животных и, таким образом, могут быть преимущественно использованы при лечении заболевания головного мозга.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи

Table with 3 columns: Antigen, CDR1, CDR2, CDR3. Rows 9101-9123 showing amino acid sequences for heavy chain variable region.

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи

Table with 3 columns: Antigen, CDR1, CDR2, CDR3. Rows 9101-9123 showing amino acid sequences for light chain variable region.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ В КАЧЕСТВЕ
АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С
БЕЛКОМ ASM, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

5

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область техники

Настоящее изобретение относится к применению антител,
специфично связывающихся с белком кислой сфингомиелиназы
10 (ASM, acid sphingomyelinase).

2. Описание уровня техники

Метаболизм сфинголипидов регулирует нормальную передачу
клеточных сигналов, а аномальные изменения метаболизма
15 сфинголипидов вызывают различные нейродегенеративные
заболевания, включая болезнь Альцгеймера. Белок кислой
сфингомиелиназы (ASM), фермент, регулирующий метаболизм
сфинголипидов, представляет собой белок, экспрессируемый
почти во всех типах клеток и играющий важную роль в
20 метаболизме сфинголипидов и обновлении клеточных мембран.

В головном мозге пациентов с нейродегенеративными
заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, активность
белка ASM значительно повышена по сравнению со здоровыми
людьми. В связи с этим в корейском патенте № 10-1521117
25 раскрыто, что ингибирование активности

сверхэкспрессированного белка ASM или ингибирование экспрессии белка ASM подавляет накопление β -амилоида и улучшает способность к обучению и память и, таким образом, может лечить нейродегенеративные заболевания. Недавно стало
5 известно, что активность белка ASM также повышается при неврологических заболеваниях, таких как депрессия, и, таким образом, ингибирование экспрессии или активности белка ASM эффективно для уменьшения выраженности депрессии.

Однако вещества, которые непосредственно ингибируют
10 экспрессию или активность белка ASM, не были разработаны, и было обнаружено несколько типов ингибиторов, которые косвенно ингибируют экспрессию белка ASM. Например, существуют трициклические антидепрессанты, применяемые при лечении депрессии, и их примеры включают амитриптилин, дезипрамин,
15 мипрамин и тому подобные. Несмотря на то, что эти трициклические антидепрессанты не были разработаны в качестве ингибиторов белка ASM, различные исследования показали, что такие антидепрессанты проявляют ингибирующее действие на белок ASM. Основным фармакологическим механизмом
20 трициклических антидепрессантов является то, что их активность повышается за счет ингибирования обратного захвата нейротрансмиттеров в нервных клетках, и было подтверждено, что их действие в качестве ингибитора ASM является второстепенным. Однако трициклические антидепрессанты могут
25 действовать на нервную систему и нервные клетки, вызывая

побочные эффекты, такие как ухудшение зрения, повышенная светочувствительность и рвота.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аспект настоящего изобретения относится к обеспечению применения антитела, специфично связывающегося с белком ASM.

10

В соответствии с аспектами настоящего изобретения в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения заболевания головного мозга, указанная композиция содержит в качестве активного ингредиента антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком кислой сфингомиелиназы (ASM).

15

В соответствии с аспектами настоящего изобретения в настоящем изобретении предложен функциональный оздоровительный пищевой продукт для предотвращения или облегчения заболевания головного мозга, указанный функциональный оздоровительный пищевой продукт содержит в качестве активного ингредиента антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком ASM.

20

25

В соответствии с аспектами настоящего изобретения в

настоящем изобретении предложен способ предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга, указанный способ включает стадию введения субъекту антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфично связывается с белком ASM.

В соответствии с аспектами настоящего изобретения в настоящем изобретении предложено антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком ASM, для применения в способе предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно настоящему изобретению специфично связывается с белком ASM с высокой аффинностью связывания, значительно ингибирует активность белка ASM, присутствующего в клеточной мембране, и демонстрирует эффекты улучшения когнитивной памяти, ингибирования активности белка ASM, ингибирования накопления β -амилоида и тау-белка и ингибирования развития нейровоспаления даже без проявления токсичности в моделях болезни Альцгеймера у животных, и, таким образом, может быть с успехом использовано для лечения заболевания головного мозга.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фиг. 1 показана схематическая диаграмма, демонстрирующая аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антител, полученных в соответствии с примером настоящего изобретения.

5 На Фиг. 2 показан график, иллюстрирующий связывание антител, полученных в соответствии с примером настоящего изобретения, с белком ASM, что подтверждено анализом ELISA (ИФА).

На Фиг. 3 показана схематическая диаграмма, 10 демонстрирующая антигенсвязывающие сайты антител, полученных в соответствии с примером настоящего изобретения, взаимодействующие с белком ASM, в модели структуры белка ASM.

На Фиг. 4 показана тепловая карта водородно-дейтериевого обмена для каждого из антител, полученных в 15 соответствии с примером настоящего изобретения, в отношении сапозин-домена белка ASM

На Фиг. 5 показаны графики, демонстрирующие ингибирование активности белка ASM, расположенного в клеточной мембране пациентов с болезнью Альцгеймера, 20 антителом, полученным в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 6 показан график, демонстрирующий, что антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения, ингибировало активность белка ASM, расположенного в клеточной 25 мембране у пациентов с болезнью Альцгеймера, в зависимости

от концентрации.

На Фиг. 7 показаны графики, демонстрирующие изменение метаболизма сфингомиелина в клеточной мембране пациентов с болезнью Альцгеймера антителом, полученным в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 8 показана схематическая диаграмма, демонстрирующая, что антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения, вводили животным с моделью болезни Альцгеймера.

На Фиг. 9 показан график, демонстрирующий результаты теста в водном лабиринте (бассейне) Морриса у животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 10 показан маршрут плавания животного с моделью болезни Альцгеймера, которому вводят антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 11 показаны графики, демонстрирующие время, проведенное в целевом (A0) или нецелевых (A1, A2 и A3) квадрантах животными с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 12 показаны графики, демонстрирующие длину трека (A), скорость движения (B) и число пересечений области платформы (C) для животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с

примером настоящего изобретения.

На Фиг. 13 показаны графики, демонстрирующие результаты тестов контекстного и сигнального обусловливания страха в соответствии с контекстным (А) или звуковым (В) сигналом для животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 14 показан график, демонстрирующий ингибирование активности ASM в плазме крови животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 15 показан график, демонстрирующий уровень белка ASM в плазме крови животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 16 показана экспрессия плотных бляшек β -амилоида в коре головного мозга или гиппокампе животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 17 показана экспрессия плотных и диффузных бляшек β -амилоида в коре головного мозга или гиппокампе животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 18 показаны графики, демонстрирующие экспрессию амилоида A β 40 или амилоида A β 42 в коре головного мозга или

гиппокампе животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 19 показана экспрессия тау-белка в коре
5 головного мозга или гиппокампе животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 20 показана экспрессия белка Iba-1 в коре
10 головного мозга или гиппокампе животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 21 показана экспрессия белка GFAP в коре
15 головного мозга или гиппокампе животных с болезнью Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

На Фиг. 22 показаны графики, демонстрирующие изменения в выживаемости (А) и массе тела (В) животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

20 На Фиг. 23 показана органная токсичность на животных с моделью болезни Альцгеймера, которым вводили антитело, полученное в соответствии с примером настоящего изобретения.

ЛУЧШИЙ РЕЖИМ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения заболевания головного мозга, содержащая в качестве активного ингредиента антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком кислой сфингомиелиназы (ASM).

Как описано в настоящей заявке, термин «белок кислой сфингомиелиназы (ASM)» относится к ферменту, который является членом семейства сфингомиелиназ (SMase), регулирующих метаболизм сфинголипидов. Белок ASM катализирует разложение сфингомиелина на церамид и фосфатидилхолин и может быть классифицирован как щелочная, нейтральная или кислая сфингомиелиназа в зависимости от pH, при котором проявляется его оптимальная ферментативная активность.

Белок ASM может включать любой тип белка ASM, который известен в данной области техники. В частности, белок ASM может быть получен из млекопитающего, более конкретно, человека, обезьяны, крысы или мыши. Кроме того, белок ASM может содержать все аминокислотные последовательности, известные для белка ASM в данной области техники. Например, белок ASM может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно, или нуклеиновую кислоту, кодирующую их.

Белок ASM может быть таким, который имеет вставку,

делецию или замену по меньшей мере одной аминокислоты в аминокислотной последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 66 или 67, при условии, что он сохраняет биологическую активность, эквивалентную активности белка ASM или соотносимую с ней. Замена аминокислоты может представлять собой консервативную замену, выполняемую в пределах, в которых замена не влияет или оказывает слабое влияние на весь белковый заряд, то есть полярность или гидрофобность. Белок ASM также может иметь по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% гомологии с аминокислотными последовательностями, приведёнными в SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно. Белок ASM может содержать только его часть, при условии, что эта часть сохраняет биологическую активность, эквивалентную активности белка ASM или соотносимую с ней.

Как описано в настоящей заявке, термин «антитело» относится к белку иммунной системы, который связывается с антигеном, чтобы препятствовать действию антигена или элиминировать антиген. Антитело может включать все типы антител, известные в данной области техники. В частности, антитело может включать иммуноглобулины IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, которые могут содержать тяжёлые цепи, синтезирующиеся с генов μ , δ , γ , α и ϵ , кодирующих константные области тяжёлых цепей, соответственно. В технологии антител, как правило, применяют иммуноглобулин IgG. IgG может включать изоотипы

IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые могут различаться с точки зрения структурных и функциональных характеристик. Антитело может включать полностью гуманизированное антитело, содержащее минимальную последовательность, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, человеческое антитело, содержащее последовательность человеческого происхождения, или химерное антитело, содержащее смешанные последовательности, полученные от разных видов.

IgG может иметь очень стабильную Y-образную структуру (молекулярной массой приблизительно 150 кДа), состоящую из двух белков тяжелых цепей с молекулярной массой приблизительно 50 кДа и двух белков легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 25 кДа. Тяжелые и легкие цепи, составляющие антитела, могут быть разделены на переменные области, имеющие аминокислотные последовательности, различные для разных антител, и константные области, имеющие аминокислотные последовательности, одинаковые для разных антител. Константные области тяжелой цепи включают домен CH1, шарнирную область (H), домены CH2 и CH3; каждый из доменов состоит из двух β -слоёв, которые могут быть соединены внутрицепочечной дисульфидной связью. Кроме того, константные области легкой цепи могут включать домен CL. Две переменные области тяжелой цепи и легкой цепи объединены с образованием антигенсвязывающего участка, и по одному

антигенсвязывающему участку может присутствовать в каждом из двух «плеч» Y-образной структуры. В полноразмерном антителе область, которая может связываться с антигеном, называется антигенсвязывающим фрагментом (Fab), а область, которая не может связываться с антигеном, называется кристаллизуемым фрагментом (Fc), и фрагменты Fab и Fc могут быть соединены шарнирной областью. В варианте осуществления настоящего изобретения иммуноглобулин IgG может представлять собой IgG мышино-го происхождения и, в частности, может включать константную область тяжёлой цепи иммуноглобулина IgG мыши, состоящую из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 74, и константную область λ лёгкой цепи иммуноглобулина мыши, состоящую из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 76. В альтернативном варианте иммуноглобулин IgG мышино-го происхождения может включать константную область тяжёлой цепи IgG мыши, соответствующую нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 75, и константную область λ лёгкой цепи иммуноглобулина мыши, соответствующую нуклеотидной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 77.

Антитело согласно настоящему изобретению может включать не только полноразмерное антитело, но и его антигенсвязывающий фрагмент. В частности, антигенсвязывающий фрагмент может относиться к области за исключением фрагмента Fc, чьи функции состоят в передаче

сигнала о связывании с антигеном на клетку, систему комплемента и тому подобное. Например, антигенсвязывающий фрагмент антитела может включать все виды таких фрагментов, Fab, scFv (вариабельные фрагменты антитела, соединенные в одну цепь), F(ab)2 (двухвалентный антигенсвязывающий фрагмент) и Fv (вариабельные домены VL и VH тяжёлой и лёгкой цепей из одного плеча антитела), а также может включать фрагмент антитела 3-го поколения, такой как однодоменное антитело и миниантитело.

10 В аспекте настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 53 по 72, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 101 по 15 123, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 135 по 159, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 135 по 155, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 218 по 228, и фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 259 по 269 от N-конца белка ASM. Белок ASM 20 может иметь признаки, описанные выше. В варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент, включающий аминокислоты в положениях с 53 по 72 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 25 68 (TAINLGLKKEPNVARVGSVA); фрагмент, включающий аминокислоты

в положениях с 101 по 123 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 69 (VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH); фрагмент, включающий аминокислоты

5 в положениях 135-159 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 70 (PTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRILF); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях 135-155 от N-конца белка ASM, может

10 представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 71 (PTVPKPPPKPPSPAPGAPVS); фрагмент, включающий аминокислоты в положениях от 218 до 228 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной

15 последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 72 (SGLGPAGPFDM); и фрагмент, включающий аминокислоты в положениях от 259 до 269 от N-конца белка ASM, может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 73

20 (VRKFLGPVPVY). То есть, согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться по меньшей мере с одним эпитопом, выбранным из группы, состоящей из полипептидов, приведённых в SEQ ID NO: 68-73, соответственно.

25 Используемый в настоящей заявке термин «эпитоп»

относится к специфическому участку антигена, который может быть распознан антителом, и означает антигенную детерминанту, с которой антитело может специфично связываться. Эпитоп обычно используется в том же значении, что и детерминанта, или антигенная детерминанта. Эпитоп состоит из химически 5 активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

10 В аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 (complementarity-determining region 1, участок, определяющий комплементарность 1) тяжелой цепи (X_1YX_2MS), состоящий из 15 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61, CDR2 тяжелой цепи ($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$), состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62, и CDR3 тяжелой цепи, выбранный из группы, содержащей CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотных 20 последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи ($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$), состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63, CDR2 легкой цепи ($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$), состоящий из 25 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:

64, и CDR3 лёгкой цепи ($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$), состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 65.

Термин «участок, определяющий комплементарность (CDR)»
5 относится к гипервариабельному участку, который находится в
вариабельных областях тяжёлой цепи и лёгкой цепи антитела и
имеет различную аминокислотную последовательность для
каждого антитела, и означает участок, который фактически
связывается с антигеном. В трёхмерной конформации антитела
10 CDR имеет форму петли на поверхности антитела, причём под
петлёй может существовать каркасный участок (FR, framework)
для структурной поддержки CDR. Существует три петлевые
структуры в каждой тяжёлой цепи и каждой лёгкой цепи, и эти
шесть петлевых структур могут быть объединены вместе для
15 непосредственного контакта с антигеном. Антигенсвязывающий
участок имеет шесть петлевых структур CDR, и CDR, условно,
может представлять собой CDR1 тяжёлой цепи, CDR2 тяжёлой
цепи, CDR3 тяжёлой цепи, CDR1 лёгкой цепи, CDR2 лёгкой цепи
или CDR3 лёгкой цепи.

20 Например, в CDR1 тяжёлой цепи (X_1YX_2MS), состоящем из
аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO:
61, каждая из аминокислот X_1 и X_2 может быть выбрана из кислых
и нейтральных аминокислот. В частности, X_1 может представлять
собой кислую или нейтральную аминокислоту, и X_2 может
25 представлять собой нейтральную аминокислоту. Например,

каждая из аминокислот X_1 и X_2 может быть выбрана из группы, состоящей из аспарагина (Asn), глицина (Gly), серина (Ser), аспарагиновой кислоты (Asp), аланина (Ala) и тирозина (Tyr). В частности, X_1 может представлять собой аспарагин, глицин, 5 серин или аспарагиновую кислоту, а X_2 может представлять собой аланин или тирозин. В варианте осуществления настоящего изобретения CDR1 тяжёлой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 25, 28, 31, 34, 37 или 40.

10 В CDR2 тяжёлой цепи ($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$), состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62, каждая из аминокислот X_3 - X_{10} может быть выбрана из нейтральных и основных аминокислот. В частности, каждая из аминокислот X_3 и X_4 - X_9 может представлять собой нейтральную аминокислоту, 15 и X_{10} может представлять собой нейтральную или основную аминокислоту. Например, каждая из аминокислот X_3 - X_{10} может быть выбрана из группы, состоящей из глицина, лейцина (Leu), аланина, серина, тирозина, пролина (Pro), аспарагина, лизина (Lys) и изолейцина (Ile). В частности, X_3 может представлять 20 собой глицин, лейцин, аланин или серин; X_4 может представлять собой тирозин или серин; X_5 может представлять собой пролин или тирозин; X_6 может представлять собой аспарагин или глицин; X_7 и X_8 каждый может представлять собой глицин или серин; X_9 может представлять собой аспарагин или серин; и X_{10} может 25 представлять собой лизин или изолейцин. В варианте

осуществления настоящего изобретения CDR2 тяжёлой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 26, 29, 32, 35, 38 или 41.

В CDR1 лёгкой цепи ($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$), состоящем из
5 аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 63, каждая из аминокислот X_{11} - X_{14} может быть выбрана из нейтральных аминокислот. Например, каждая из аминокислот X_{11} - X_{14} может быть выбрана из группы, состоящей из треонина (Thr), серина, аспарагина, аланина, пролина и тирозина. В
10 частности, X_{11} может представлять собой треонин или серин; X_{12} может представлять собой аспарагин или серин; X_{13} может представлять собой аланин, пролин, треонин или тирозин; и X_{14} может представлять собой аспарагин, тирозин или серин. В варианте осуществления настоящего изобретения CDR1 лёгкой
15 цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55 или 58.

В CDR2 легкой цепи ($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$), состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 64, каждая из аминокислот X_{15} - X_{18} может быть выбрана из кислых,
20 нейтральных и основных аминокислот. В частности, каждая из аминокислот X_{15} и X_{16} может представлять собой кислую или нейтральную аминокислоту, и X_{17} может представлять собой нейтральную аминокислоту, и X_{18} может представлять собой основную или нейтральную аминокислоту. Например, каждая из
25 аминокислот X_{15} - X_{18} может быть выбрана из группы, состоящей из

тирозина, аланина, аспарагиновой кислоты, серина, аспарагина, гистидина (His), глутамина (Gln) и лизина. В частности, X₁₅ может представлять собой тирозин, аланин, аспарагиновую кислоту или серин; X₁₆ может представлять собой аспарагиновую кислоту или аспарагин; X₁₇ может представлять собой серин или аспарагин; и X₁₈ может представлять собой гистидин, глутамин или лизин. В варианте осуществления настоящего изобретения CDR2 лёгкой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 или 59.

В CDR3 лёгкой цепи (X₁₉X₂₀WDX₂₁SLX₂₂X₂₃YV), состоящем из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 65, каждая из аминокислот X₁₉-X₂₃ может быть выбрана из нейтральных аминокислот. Например, каждая из аминокислот X₁₉-X₂₃ может быть выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты и аспарагина. В частности, X₁₉ может представлять собой глицин или аланин; X₂₀ может представлять собой аланин, серин или треонин; X₂₁ может представлять собой тирозин, серин, аланин или аспарагиновую кислоту; X₂₂ может представлять собой серин или аспарагин; и X₂₃ может представлять собой аланин или глицин. В варианте осуществления настоящего изобретения CDR3 лёгкой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 или 60.

В другом аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную область тяжелой цепи, включая CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 25, 28, 31, 34, 37 и 40, соответственно, CDR2 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 26, 29, 32, 35, 38 и 41, соответственно, и CDR3 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42, соответственно; и переменную область легкой цепи, включая CDR1 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55 и 58, соответственно, CDR2 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 и 59, соответственно, и CDR3 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 и 60, соответственно.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать: переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области тяжелой цепи, включающей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведенных

в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно, переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и переменную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно; и переменную область лёгкой цепи, выбранную из группы, состоящей из переменной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных

последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно, переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60, соответственно.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать: переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно; переменную область

тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно; переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно; или переменную область тяжёлой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно, и переменную область лёгкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60,

соответственно.

Например, переменная область тяжелой цепи может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9
5 или 11, а переменная область легкой цепи может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 или 23.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий
10 фрагмент согласно настоящему изобретению можно модифицировать по мере необходимости. В частности, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицировать путем конъюгации, гликозилирования, мечения или их комбинации. В частности, антитело или его
15 антигенсвязывающий фрагмент могут быть модифицированы пероксидазой хрена (HRP), щелочной фосфатазой, гаптеном, биотином, стрептавидином, флуоресцентным веществом, радиоактивным веществом, квантовой точкой, полиэтиленгликолем (ПЭГ), гистидиновой меткой или тому
20 подобным. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также можно конъюгировать с другим лекарственным средством по мере необходимости.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть получено в соответствии со способом получения моноклонального
25 антитела, известным в данной области техники, и способ

получения может быть соответствующим образом модифицирован специалистом в данной области техники. Например, антитело может быть получено путём получения гибридом с использованием В-лимфоцитов, полученных из животного, иммунизированного антигеном, или может быть получено с использованием технологии фагового дисплея.

В другом аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включенный в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Поскольку аминокислотная последовательность, составляющая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, известна, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая её, также будет очевидна специалисту в данной области техники. Последовательность нуклеиновой кислоты может иметь по меньшей мере одну вставку, делецию или замену нуклеотидов при условии сохранения активности антитела или его транслированного антигенсвязывающего фрагмента.

В ещё одном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин «вектор экспрессии» представляет собой средство для экспрессии гена-мишени в клетке-хозяине и может

включать все такие средства: плазмидный вектор, космидный вектор, вектор-бактериофаг, вирусный вектор и тому подобное. Вектор экспрессии может включать элементы, необходимые для синтеза пептида с нуклеиновой кислоты, включённой в него. В частности, вектор экспрессии может включать сигнальную последовательность, точку начала репликации, маркерный ген, промотор, последовательность терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, может быть функционально связана с промотором.

Например, вектор экспрессии, используемый в прокариотических клетках, может включать промотор для транскрипции, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательности терминации для транскрипции и трансляции. Вектор экспрессии, используемый в эукариотических клетках, может включать промотор и последовательность полиаденилирования, полученную из млекопитающего или вируса млекопитающего.

Все маркерные гены, известные в данной области техники, могут быть использованы в качестве маркерного гена, включенного в вектор экспрессии, и могут представлять собой, в частности, ген устойчивости к антибиотикам. В частности, ген устойчивости к антибиотикам может представлять собой ген, кодирующий устойчивость к антибиотикам, включая ампициллин, гентамицин, карбенициллин, хлорамфеникол, стрептомицин,

канамицин, неомицин, тетрациклин и тому подобное.

В ещё одном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может включать в качестве активного ингредиента

5 клетку-хозяин, содержащую нуклеиновую кислоту или экспрессионный вектор, как описано выше. Все типы клеток, которые, как известно, можно применять для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов в данной области техники, можно применять в качестве клетки-хозяина. В

10 частности, клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, дрожжи или эукариотическую клетку. Примеры прокариотических клеток могут включать *E. coli*, штаммы рода *Bacillus*, штамм рода *Streptomyces*, штамм рода *Pseudomonas*, штамм рода *Staphylococcus* и тому подобное, а

15 примеры дрожжей могут включать *Saccharomyces cerevisiae* и тому подобное. Пример эукариотической клетки может включать клетки линий COS-7, ВНК, CHO, CHO-K1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, HEK293, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC-12, K-

20 562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, HT1080 и тому подобные.

Клетка-хозяин может быть трансдуцирована нуклеиновой кислотой или вектором экспрессии, как описано выше, в соответствии со способом, известным в данной области техники. В частности, трансдукция может быть выполнена путём временной

25 трансфекции, микроинъекции, трансдукции, клеточной инфузии,

осаждения фосфатом кальция, опосредованной липосомами трансфекции, опосредованной ДЭАЭ-декстраном трансфекции, опосредованной полибренном трансфекции, электропорации, генной пушки или тому подобного. Способы также могут быть
5 соответствующим образом модифицированы специалистом в данной области техники.

Заболевание головного мозга может включать все типы заболеваний головного мозга, известных в данной области техники, и, в частности, заболевание головного мозга может
10 представлять собой дегенеративное заболевание головного мозга. Например, дегенеративное заболевание головного мозга может представлять собой заболевание, при котором уровень экспрессии или агрегации β -амилоида повышен, либо существует риск превышения нормы. Например, дегенеративное заболевание
15 головного мозга может представлять собой деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, легкое когнитивное расстройство, церебральную амилоидную ангиопатию, синдром Дауна, амилоидный инсульт, системный амилоидоз, амилоидоз голландского типа, болезнь Ниманна-
20 Пика, старческую деменцию, боковой амиотрофический склероз, спиноцереbellарную атаксию, синдром Туретта, атаксию Фридриха, болезнь Мачадо-Джозефа, деменцию с тельцами Леви, дистонию, прогрессирующий надъядерный паралич или лобно-височную деменцию.

25 Фармацевтическая композиция согласно настоящему

изобретению может содержать антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое является активным ингредиентом и специфично связывается с белком ASM, в количестве от 10 до 95 массовых % относительно её общей массы.

5 Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может также содержать, в дополнение к указанному выше активному ингредиенту, по меньшей мере один активный ингредиент, который обладает аналогичной или сходной функцией, что и указанный выше ингредиент.

10 Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать носители, разбавители, вспомогательные вещества или их смеси, обычно используемые в биологических препаратах. Можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, если он подходит для
15 доставки композиции в организм. В частности, носитель может представлять собой соединения, описанные в руководстве Merck Index, 13-е изд., Merck & Co. Inc., физиологический раствор, стерильную воду, раствор Рингера, раствор декстрозы, раствор мальтодекстрина, глицерин, этанол или их смеси. Кроме того,
20 при необходимости могут быть внесены другие типичные добавки, такие как антиоксидант, буфер и бактериостатический агент.

При составлении вышеуказанной композиции могут быть добавлены разбавители или вспомогательные вещества, такие как наполнитель, экстендер, связывающее вещество, смачивающий
25 агент, разрыхлитель или поверхностно-активное вещество.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть в форме перорального препарата или препарата для парентерального введения. Примеры перорального препарата могут включать твердый препарат и жидкий препарат. Твердый препарат может представлять собой таблетку, пилюлю, порошок, 5 гранулы, капсулу или драже, и эти твердые препараты могут быть получены путём добавления к композиции по меньшей мере одного вспомогательного вещества. Вспомогательное вещество может представлять собой крахмал, карбонат кальция, сахарозу, 10 лактозу, желатин или их смесь. Твердый препарат может включать смазывающее вещество, и его примерами могут быть стеарат магния, тальк и тому подобное. Жидкий препарат может представлять собой суспензию, жидкость для приема внутрь, эмульсию или сироп. Жидкий препарат может включать 15 вспомогательное вещество, такое как смачивающий агент, подсластитель, ароматический агент или консервант и т.п.

Примеры парентерального препарата могут включать инъекцию, суппозиторий, порошок для дыхательной ингаляции, аэрозоль для распыления, порошок, крем и тому подобное. 20 Инъекция может включать стерильный водный раствор, неводный растворитель, суспензию, эмульсию и тому подобное. В качестве примеров неводного растворителя или суспензии можно использовать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, сложный эфир 25 для инъекций, такой как этилолеат, и тому подобное.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен функциональный оздоровительный пищевой продукт для предотвращения или облегчения заболевания головного мозга, причём функциональный оздоровительный пищевой продукт 5 содержит в качестве активного ингредиента антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком ASM.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое 10 специфично связывается с белком ASM и содержится в качестве активного ингредиента в функциональном оздоровительном пищевом продукте согласно настоящему изобретению, может иметь характеристики, описанные выше.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое 15 специфично связывается с белком ASM согласно настоящему изобретению, может быть добавлено в том виде, в каком оно находится в пищевом продукте, или может быть использовано вместе с другими пищевыми продуктами или пищевыми ингредиентами. Содержание добавленного активного 20 ингредиента может быть определено в соответствии с назначением и обычно может составлять от 0,01 до 90 частей по массе относительно общей массы пищевого продукта.

Форма и вид функционального оздоровительного пищевого продукта не имеют особых ограничений. В частности, 25 функциональный оздоровительный пищевой продукт может быть

представлен в форме таблетки, капсулы, порошка, гранул, жидкости и пилюли. В качестве дополнительных ингредиентов в состав функционального оздоровительного пищевого продукта могут входить различные ароматизаторы, подсластители или
5 натуральных углеводов. Подсластитель может представлять собой натуральный или синтетический подсластитель, и примеры натурального подсластителя включают тауматин, экстракт стевии и тому подобное. Примерами синтетического подсластителя являются сахарин, аспартам и тому подобное.
10 Кроме того, натуральные углеводы могут представлять собой моносахариды, дисахариды, полисахариды, олигосахариды и сахарные спирты.

Функциональный оздоровительный пищевой продукт согласно настоящему изобретению может также включать, помимо
15 вышеописанных дополнительных ингредиентов, пищевые добавки, витамины, электролиты, вкусоароматические добавки, красители, пектиновую кислоту и её соли, альгиновую кислоту и её соли, органические кислоты, защитные коллоидные загустители, регуляторы уровня кислотности, стабилизаторы,
20 консерванты, глицерин, спирты и тому подобное. Эти ингредиенты могут быть использованы по отдельности или в комбинации. Пропорция такой добавки может быть выбрана в диапазоне от 0,01 до 0,1 частей по массе относительно 100 частей по массе композиции согласно настоящему изобретению.

В соответствии с аспектами настоящего изобретения в настоящем изобретении предложен способ предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга, включающий стадию введения субъекту антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфично связывается с белком ASM.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком ASM, вводимое для предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга согласно настоящему изобретению, может иметь характеристики, описанные выше.

Субъект может представлять собой млекопитающее и, в частности, человека.

В зависимости от способа применения препарат может вводиться перорально или парентерально. Парентеральное введение может включать внутрибрюшинное, ректальное, подкожное, внутривенное, внутримышечное или внутригрудное введение.

Кроме того, активный ингредиент может быть введен в фармацевтически эффективном количестве. Фармацевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от типа или тяжести заболевания, активности лекарственного средства, чувствительности пациента к лекарственному средству, времени введения, способа введения, продолжительности лечения, сопутствующих лекарственных

средств, используемых с композицией, и тому подобного. Однако для достижения желаемого эффекта количество активного ингредиента, включенного в фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, может составлять от 0,0001
5 до 1000 мг/кг, в частности от 0,001 до 500 мг/кг. Введение может осуществляться один или несколько раз в день.

Вводимое лекарство может назначаться отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами. При комбинированном применении введение может быть осуществлено
10 последовательно или одновременно.

В соответствии с аспектами настоящего изобретения, в рамках настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающееся с
15 белком ASM, для применения в способе предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с белком ASM для применения в способе предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного
20 мозга согласно настоящему изобретению, может иметь характеристики, описанные выше.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Далее настоящее изобретение подробно описано следующими

примерами. Однако следующие приведённые в качестве примера варианты осуществления предназначены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объёма настоящего изобретения. Любой вариант осуществления, который имеет по существу ту же структуру, что и техническое решение, описанное в формуле изобретения, и достигает тех же эффектов действия, включён в технический объём настоящего изобретения.

10 **Пример 1: Получение антител, специфично связывающихся с белком кислой сфингомиелиназы (ASM)**

Антитела, которые специфично связываются с белком ASM человека (SEQ ID NO: 66) и белком ASM мыши (SEQ ID NO: 67), получали следующим образом.

15 В частности, рекомбинантные белки ASM человека и мыши, а также синтетическая фаговая библиотека фрагментов scFv человека были использованы для скрининга и отбора фагов с scFv, которые специфично связывают белок ASM человека или белок ASM мыши, с помощью панорамирования обычным способом.

20 Были проанализированы последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранные scFv, и идентифицированы транскрибируемые из них аминокислотные последовательности. Был сконструирован вектор для экспрессии константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши и константной области легкой цепи λ

25 иммуноглобулина мыши, включающий нуклеотидные

последовательности, приведённые в SEQ ID NO: 75 и 77, соответственно, соединённые с С-концами вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи каждой из идентифицированных последовательностей scFv. Аминокислотные последовательности и нуклеиновокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи, составляющих фрагмент scFv, содержащиеся в полученных векторах экспрессии, показаны в Таблице 1, а аминокислотные последовательности и нуклеиновокислотные последовательности его вариабельных областей лёгкой цепи показаны в Таблице 2.

ТАБЛИЦА 1

Антитело №	Последовательность	Порядковый номер последовательности
#9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIYPNGGNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNAYRFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 1
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGGATCTATCCTAATGG TGGTAATAAATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAAATGCTTATCGTTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 2
#9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSWHHFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 3
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCGGTTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA	SEQ ID NO: 4

	GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTGATCTCTCCTGGTAG TGGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAATCTTGGCATCATTTGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	
#9104	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYMSWVRQAP GKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTPGFYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 5
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGGATCTATTATGGTAG TGGTAATATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATACGCTGGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 6
#9108	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYMSWVRQAP GKGLEWVSAIYPGGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDV LGLTPKPFYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 7
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATCTATCCTGGTGG TGGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATGTTTTGGGTCTGACTCCTAAGCCGTTTCGACT ACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 8
#9113	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYYMSWVRQAP GKGLEWVSSISPGGSSIIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGASLFDYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 9
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAGTTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCGATCTCTCCTGGTGG TAGTAGTATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGGGCTCTCTGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTA CACTGGTCACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 10

#9123	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRRQCYDYGMDVWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 11
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCGATTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATCTCTTATGGTGG TGGTAATATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGAGTTGGTGGTATGTGTACTAGGCGTCAGTGTATT ATGATTATGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGTACACTGGTC ACCGTGAGCTCA	SEQ ID NO: 12

ТАБЛИЦА 2

Антитело №	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPG TAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLRSEDE ADYYCGSWDYSLNAYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 13
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTTTCATCCAAT ATTGGCAATAATTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTGATAGTAAGCGGCCA AGCGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCGCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCCTGAATGCT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 14
#9102	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNPVYWYQQLPG TAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYCAAWDSLSLGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 15
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTTTCATCTAAT ATTGGCAATAATCCTGTCTACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTAATAATCAGCGGCCA AGCGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGCTGCTTGGGATTCTAGCCTGAGTGGT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 16
#9104	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNVNWYQQLPG	SEQ ID

	TAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGAWDYSL SAYVFGGGTKLTVL	NO: 17
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTACTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAATAATGCTGTCAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATTATGATAGTCATCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTGCTTGGGATTATAGCCTGAGTGCT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 18
#9108	QSVLTQPPSASGTPGQRVTL SCTGSSSNIGSNTVYWYQQLPG TAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGSWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 19
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCTCTCTTGTACTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAGTAATACTGTCTACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTAATAGTCAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTCTTGGGATTATAGCCTGAGTGGT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 20
#9113	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCGSSSNIGNNAVSWYQQLPG TAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGTWDASLNAYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 21
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGTGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAATAATGCTGTCTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATTCTGATAATAAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGCTAGCCTGAATGCT TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	SEQ ID NO: 22
#9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCGSSSNIGSNTVNWYQQLPG TAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDE ADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	SEQ ID NO: 23
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGGCTCTTCATCTAAT ATTGGCAGTAATACTGTCAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGATAATAGTAAGCGGCCA AGCGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAAGATGAG GCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGATAGCCTGAGTGGT	SEQ ID NO: 24

	TATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTACGGTCCTA	
--	--------------------------------------	--

В качестве указанного вектора экспрессии использовали вектор экспрессии млекопитающих. Полученными экспрессионными векторами трансформировали клеточную линию CHO или HEK293 для получения полноразмерных антител, связывающихся либо с белком ASM человека, либо как с белком ASM человека, так и с белком ASM мыши.

Пример 2: Идентификация участков, определяющих комплементарность (CDR)

Определяющие комплементарность участки в полученных фрагментах scFv идентифицировали обычным способом, и полученные в результате последовательности CDR переменных областей тяжелых цепей представлены в Таблице 3, а последовательности CDR переменных областей легких цепей представлены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 3

Антитело №	CDR	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	CDR1	NYAMS	SEQ ID NO: 25
	CDR2	GIYPNGGNKYYADSVKG	SEQ ID NO: 26
	CDR3	NAYRFDY	SEQ ID NO: 27
#9102	CDR1	GYYS	SEQ ID NO: 28
	CDR2	LISPGSGSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 29
	CDR3	SWHFFDY	SEQ ID NO: 30
#9104	CDR1	NYYS	SEQ ID NO: 31
	CDR2	GIYYGSGNIYYADSVKG	SEQ ID NO: 32
	CDR3	DTPGFDY	SEQ ID NO: 33

#9108	CDR1	NYAMS	SEQ ID NO: 34
	CDR2	AIYPPGGGSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 35
	CDR3	DVLGLTPKPFDY	SEQ ID NO: 36
#9113	CDR1	SYMS	SEQ ID NO: 37
	CDR2	SISPPGGGSIYYADSVKG	SEQ ID NO: 38
	CDR3	GASLFDY	SEQ ID NO: 39
#9123	CDR1	DYAMS	SEQ ID NO: 40
	CDR2	AISYGGGNIYYADSVKG	SEQ ID NO: 41
	CDR3	VGGMCTRRQCYDYGMDV	SEQ ID NO: 42

ТАБЛИЦА 4

Антитело №	CDR	Последовательность	SEQ ID NO
#9101	CDR1	SGSSSNIGNNYVS	SEQ ID NO: 43
	CDR2	ADSKRPS	SEQ ID NO: 44
	CDR3	GSWDYSLNAYV	SEQ ID NO: 45
#9102	CDR1	SGSSSNIGNNPVY	SEQ ID NO: 46
	CDR2	ANNQRPS	SEQ ID NO: 47
	CDR3	AAWDSSLGGYV	SEQ ID NO: 48
#9104	CDR1	TGSSSNIGNNAVN	SEQ ID NO: 49
	CDR2	YDSHRPS	SEQ ID NO: 50
	CDR3	GAWDYSLSAYV	SEQ ID NO: 51
#9108	CDR1	TGSSSNIGSNTVY	SEQ ID NO: 52
	CDR2	ANSQRPS	SEQ ID NO: 53
	CDR3	GSWDYSLGGYV	SEQ ID NO: 54
#9113	CDR1	SGSSSNIGNNAVS	SEQ ID NO: 55
	CDR2	SDNKRPS	SEQ ID NO: 56
	CDR3	GTWDASLNAYV	SEQ ID NO: 57
#9123	CDR1	SGSSSNIGSNTVN	SEQ ID NO: 58
	CDR2	DNSKRPS	SEQ ID NO: 59
	CDR3	GTWDDSLGGYV	SEQ ID NO: 60

Экспериментальный пример 1: Подтверждение связывания с

5 белком ASM

Связывание с белком ASM полученных антител, специфично связывающихся с белком ASM, анализировали методом ELISA.

Сначала по 100 мкл раствора рекомбинантного белка ASM

человека с концентрацией 1 мкг/мл (R&D systems) добавляли в лунки 96-луночного планшета (Thermo Scientific) и оставляли при 4 °С в течение 16 часов для сорбирования планшета белком. Затем в лунки сорбированного планшета добавляли по 200 мкл

5 PBS, содержащего 5% BSA, с последующей инкубацией при 37 °С в течение приблизительно 2 часов, а затем планшет трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20. В планшет наносили антитела к белку ASM в концентрации 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 или 100 нМ, с последующей инкубацией при 37 °С в течение

10 приблизительно 1 часа. После инкубации планшет трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20, и добавляли по 100 мкл конъюгата с пероксидазой хрена козьих антимышиных антител IgG-HRP (Jackson Immunoresearch) в качестве вторичного антитела. После повторной инкубации при 37 °С в течение

15 приблизительно 1 часа планшет трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20. Затем в планшет добавляли по 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) с последующей дополнительной инкубацией при комнатной температуре в течение приблизительно 5 минут, после чего реакцию прекращали с

20 помощью добавления 100 мкл 2-нормального раствора серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Результаты измеренной оптической плотности показаны на Фиг. 2, а значения EC₅₀ (half maximal effective concentration) антител, рассчитанные по значениям оптической плотности,

25 показаны в Таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Антитело №	EC ₅₀ (нМ)
#9101	0,0815
#9102	0,0954
#9104	1,948
#9108	0,3269
#9123	0,7578

Как показано на Фиг. 2, все пять типов полученных
5 антител, описанных выше, связывались с белком ASM в зависимости от концентрации. В частности, как показано в Таблице 5, антитело #9101 показало самое низкое значение EC₅₀ и, таким образом, обладало самой высокой способностью связываться с белком ASM.

10

Экспериментальный пример 2: Подтверждение аффинности связывания с белком ASM

Аффинность связывания и интерактивную динамику взаимодействия с белком ASM полученных выше антител,
15 специфично связывающихся с белком ASM, измеряли с помощью системы анализа межмолекулярных взаимодействий Octet® QK384 (Pall Life® Sciences).

Сначала биосенсор AR2G (ForteBio) обрабатывали раствором 20 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимидом
20 гидрохлорида (EDC) и 40 мМ N-гидроксисульфосукцинимидом (sulfo-NHS) для активации карбоксильных групп. Затем

растворы рекомбинантного белка ASM человека в концентрации 10 мкг/мл или рекомбинантного белка ASM мыши в концентрации 2,5 мкг/мл получали путем разведения в 10 мМ растворе ацетата натрия (pH 5,0) (ForteBio). Раствор с разведённым белком ASM добавляли к биосенсору AR2G с активированной карбоксильной группой для получения биосенсора AR2G с иммобилизованным рекомбинантным белком ASM человека или мыши. К биосенсору, на котором иммобилизовали полученный белок ASM, добавляли 1 М этаноламин (ForteBio) для инактивации оставшихся непрореагировавших карбоксильных групп. Антитела, полученные в Примере 1, добавляли к биосенсору в концентрациях 0,4, 2 или 10 нМ, и затем фазу связывания продукта реакции наблюдали в течение приблизительно 900 секунд. Далее добавляли 1x-кратный буфер для кинетического анализа (ForteBio), и фазу диссоциации продукта реакции наблюдали в течение приблизительно 1200 секунд. Константу ассоциации (K_{on}), константу диссоциации (K_{dis}) и равновесную константу диссоциации (KD) каждого антитела определяли с использованием программного обеспечения для анализа Octet® (Pall Life® Sciences). Результаты анализа рекомбинантного белка ASM человека приведены в Таблице 6, а результаты анализа рекомбинантного белка ASM мыши приведены в Таблице 7.

25 ТАБЛИЦА 6

Антитело №	K_D (М)	K_{on} (М ⁻¹ *с ⁻¹)	K_{dis} (с ⁻¹)	R_{Max}	Полный R^2
#9101	1.16E-09	6,26E+05	7.28E-04	0,4527	0,9861
#9102	2.52E-10	4,16E+05	1,05E-04	0,8652	0,997
#9104	2,09E-10	3,92E+05	8,18E-05	0,3324	0,9759
#9108	1.19E-10	2,49E+05	2,96E-05 и 2,96E-05	0,45	0,999
#9113	5,64E-10	1,16E+06	6,56E-04	0,2868	0,9635

ТАБЛИЦА 7

Антитело №	K_D (М)	K_{on} (М ⁻¹ *с ⁻¹)	K_{dis} (с ⁻¹)	R_{Max}	Полный R^2
#9101	4,25E-11	3,76E+06	1,59E-04	0,0185	0,5527
#9102	4,98E-10	4,89E+05	2,43E-04	0,4281	0,9944
#9104	6,38E-10	3.10E+05	1,98E-04	0,7027	0,9971
#9108	3,39E-09	4,59E+05	1,56E-03	0,3921	0,9865
#9113	<1,0E-12	1,00E+06	<1,0E-07	0	0

Как показано в Таблице 6, пять типов антител, полученных в Примере 1, связывались с белком ASM человека с аффинностью связывания от 10^{-10} до 10^{-9} М. В то время как только антитела #9102, #9104 и #9108 показали аффинность связывания от 10^{-10} до 10^{-9} М с белком ASM мыши, как показано в Таблице 7.

10 **Экспериментальный пример 3: Идентификация антигенной детерминанты белка ASM**

Участки белка ASM, с которыми связывались антитела согласно настоящему изобретению, то есть антигенные детерминанты, исследовали с помощью масс-спектрометрии с использованием водородно-дейтериевого обмена (hydrogen deuterium exchange mass spectrometry, HDX-MS).

15

Сначала белок ASM в концентрации 1000 мкг/мл, антитела mIgG1 #9101 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG2 #9102 в концентрации 1250 мкг/мл, mIgG4 #9104 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG1 #9108 в концентрации 1000 мкг/мл, mIgG1 #9113
5 в концентрации 3300 мкг/мл или mIgG1 #9123 в концентрации 2932 мкг/мл последовательно разводили с использованием двукратных серийных разведений для получения 128-кратного разведения. Затем отбирали 1 мкл каждого из полученных разведений и смешивали с равным количеством синапиновой
10 кислоты с концентрацией 10 мг/мл в качестве матрицы (набор для анализа K200 MALDI, CovalX), и 1 мкл смеси наносили на подложки-мишени SCOUT 384 MALDI с последующей кристаллизацией при комнатной температуре. После этого кристаллы анализировали с использованием масс-спектрометра MALDI. Для
15 получения данных шивки при анализе нековалентных взаимодействий 1 мкл каждого из 128-кратных разведений смешивали с равным количеством реагента-стабилизатора K200 с концентрацией 2 мг/мл (набор K200 MALDI, CovalX) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 3
20 часов. После завершения реакции 1 мкл смешанного раствора подвергали анализу с использованием масс-спектрометра MALDI, и результаты измерений анализировали в режиме высокого разрешения MALDI MS. Результаты анализа пептидных последовательностей участков, которые были идентифицированы
25 как имеющие значительную разницу во включении дейтерия в

белок ASM, показаны в Таблице 8, а модели структуры белка ASM человека, показывающие участки связывания белка ASM с каждым антителом, показаны на Фиг. 3. Тепловая карта дейтериевого обмена для каждого из антител в отношении сапозин-домена 5 белка ASM показана на Фиг. 4.

ТАБЛИЦА 8

Антитело №	Область пептида	Аминокислотная последовательность
#9101	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9102	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
	218-228	SGLGPAGPFDM
#9104	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9108	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9113	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	101-123	VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9123	259-269	VRKFLGPVPVY

Как показано в Таблице 8 и на Фиг. 3, антитела согласно
10 настоящему изобретению связывались с аминокислотным
фрагментом в положениях с 53 по 72 (SEQ ID NO: 68,
TAINLGLKKEPNVARVGSVA), аминокислотным фрагментом в
положениях с 101 по 123 (SEQ ID NO: 69,
VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH), аминокислотным фрагментом в
15 положениях с 135 по 159 (SEQ ID NO: 70,
PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF), аминокислотным фрагментом в

положениях с 135 по 155 (SEQ ID NO: 71, PTVPKRRPKPPSPAPGAPVS), аминокислотным фрагментом в положениях с 218 по 228 (SEQ ID NO: 72, SGLGPAGPFDM) или аминокислотным фрагментом в положениях с 259 по 269 (SEQ ID NO: 73, VRKFLGPVPVY) от N-конца белка ASM. В частности, как показано на Фиг. 4, антитела согласно настоящему изобретению в основном связывались с α -спиралью 1 и α -спиралью 2 в сапозин-домене.

10 **Экспериментальный пример 4: Ингибирование активности белка ASM**

4-1. Ингибирование активности белка ASM

Было изучено, ингибируют ли полученные антитела, специфично связывающиеся с белком ASM, активность белка ASM, расположенного в клеточной мембране.

Сначала фибробласты (Coriell Institute) пациентов с болезнью Альцгеймера обрабатывали антителами, полученными в Примере 1, в концентрации 3 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. После этого клетки собирали и клеточную мембрану отделяли, используя набор для экстракции мембранных белков Mem-PER™ Plus (Thermo) в соответствии с протоколом производителя, с последующей экстракцией белков. Экстрагированный белок помещали в качестве образца во вставку для СВЭЖХ (сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография)

и подвергали анализу СВЭЖХ (Waters, 186004800) обычным способом, и результаты показаны на Фиг. 5. Антитело #9105, для которого было подтверждено, что оно не связывается с белком ASM, использовали в качестве контроля.

5 Как показано на Фиг. 5, из шести типов антител, полученных в Примере 1, антитело #9104 значительно ингибировало активность белка ASM, повышенную в клеточной мембране пациентов с болезнью Альцгеймера.

10 4-2. Ингибирование активности белка ASM в зависимости от применяемой концентрации антитела к ASM

За исключением того, что антитело #9104, полученное в Примере 1, применяли в концентрации 0,03, 0,3, 3, 30, 300 или 3000 нг/мл, изменения активности белка ASM, расположенного в
15 клеточной мембране, исследовали с помощью того же способа, как и в Экспериментальном примере 4-1 выше. Результаты показателей анализируемого ингибирования активности (%) белка ASM представлены на Фиг. 6 и в Таблице 9. В качестве контроля использовали антитело #9105.

20

ТАБЛИЦА 9

Концентрация препарата (нг/мл)	Ингибирование активности белка ASM (%)	
	#9104	#9105
0,03	0	-
0,3	7,9	-
3	16	-

30	21	-
300	28	-
3000	32	9

Как показано на Фиг. 6 и в Таблице 9, антитело #9104 согласно настоящему изобретению значительно ингибировало активность белка ASM, расположенного в клеточной мембране, в зависимости от применяемой концентрации. При этом антитело #9105, используемое в качестве контроля, незначительно ингибировало активность белка ASM, расположенного в клеточной мембране, только при концентрации обработки 3000 нг/мл или более.

10

Экспериментальный пример 5: Изменение метаболизма сфинголипидов

Изменение метаболизма сфинголипидов в клеточной мембране клеток, обработанных антителом 9104 в концентрации 3 мкг/мл, как описано в Экспериментальном примере 4-1, исследовали через изменения содержания сфингомиелина и церамида. Эксперимент проводили обычным способом, и результаты измерений содержания сфингомиелина и церамида показаны на Фиг. 7.

20

Как показано на Фиг. 7, содержание церамида, присутствующего в клеточной мембране фибробластов пациентов с болезнью Альцгеймера, было значительно снижено при обработке антителом #9104, но значительных изменений в

содержании сфингомиелина не имелось.

Результат показал, что антитело согласно настоящему изобретению ингибирует деградацию сфингомиелина белком ASM.

5 **Экспериментальный пример 6: Улучшение когнитивной памяти**

Изменение когнитивной памяти мышей изучали при помощи введения антитела #9104 мышам APP/PS1, животной модели болезни Альцгеймера.

10

6-1. Введение антитела к белку ASM

Мышам APP/PS1 в возрасте 7 месяцев внутрибрюшинно вводили 324 мкл антитела #9104 в дозе 50 мг/кг в течение 8 недель. Введение проводили два раза в неделю (с интервалом в 3 дня), и антитело #9104 вводили в общей сложности 16 раз (Фиг. 8). Потомство мышей, родившихся в результате скрещивания мышей C57BL/6 и APP/PS1 и не получавших никакого вещества, использовали в качестве контрольной группы, не получавшей лечения, и мышей APP/PS1, получавших 324 мкл буфера PBS, использовали в качестве группы отрицательного контроля (плацебо).

20

6-2. Улучшение когнитивной памяти-(1)

Поведенческий тест проводили с 41-го дня до последнего дня введения антитела #9104 для изучения изменений

25

когнитивной памяти, вызванных введением антитела.

Сначала отталкивание каждой мыши от тестировщика устраняли с помощью многократного повторения удержания хвоста мыши и размещения мыши на руке и тыльной стороне кисти тестировщика в течение 5 минут с 41-го дня введения, а затем отталкивание мыши от воды устраняли путем акклиматизации мыши к воде в течение 30 минут перед испытанием. В небольшом резервуаре с водой была установлена скрытая платформа, при этом с четырёх сторон резервуара находились удалённые от него пространственные визуальные подсказки-метки. Мышь помещали в резервуар с водой 10 раз и обучали плавать и находить платформу. Мыши давали оставаться на платформе в течение 10 секунд после тренировочного плавания всякий раз, когда она находила платформу, и через 10 секунд ей давали снова войти в воду. Этот раунд был повторен 10 раз, в течение которых мышь обучали находить платформу с различных направлений, при этом направление стартовых позиций менялось. Испытание в водном лабиринте Морриса проводили с 42-го по 51-й день после начала введения веществ. В частности, метки помещались с четырёх сторон резервуара с водой, и каждую мышь тестировали четыре раза (ограничение по времени 60 секунд для каждого раза) в одно и то же время каждый день, и это повторяли в общей сложности 10 раундов, чтобы фиксировать время, необходимое для нахождения платформы. На 52-й день от момента введения веществ был проведён пробный тест со снятой

платформой для воспроизведения нахождения места, где платформа присутствовала в резервуаре с водой во время обучения, а также для фиксации длины пути и скорости пересечения других квадрантов. Результаты тестов в период 5 обучения в водном лабиринте Морриса показаны на Фиг. 9, а результаты пробного теста показаны на Фиг. 10-12.

Как показано на Фиг. 9, по мере повторения теста время в секундах задержки спасения из водного лабиринта (нахождения платформы) мышей, которым вводили антитело #9104, значительно 10 сокращалось. Мыши в группе отрицательного контроля показали время задержки спасения в среднем 30 секунд, что указывает на нарушение когнитивной функции, а мыши в контрольной группе без лечения показали сокращение времени задержки спасения по мере повторения теста. В частности, группа, которой вводили 15 антитело #9104, продемонстрировала снижение времени задержки спасения на 31,5% в 9-м раунде и снижение на 30,8% в 10-м раунде по сравнению с мышами группы отрицательного контроля.

Как показано на Фиг. 10 и 11, у мышей, которым вводили антитело #9104, время, проведённое в целевом квадранте, 20 значительно превышало время, проведённое в нецелевых квадрантах. Этот результат был аналогичен таковому в контрольной группе, не получавшей лечения, и отличался от такового в группе отрицательного контроля, показавшей незначительную разницу между временем, проведённым в целевом 25 квадранте, и временем, проведённым в нецелевых квадрантах.

Как показано на Фиг. 12С, частота пересечения платформы была значительно увеличена в группе, которой вводили антитело #9104, но снижена в группе отрицательного контроля. Как показано на Фиг. 12А и 12В, все группы мышей оказались сходными с точки зрения длины пути и скорости плавания, что указывает на то, что введение антитела #9104 не влияло на способность выдерживать физическую нагрузку.

6-3. Улучшение когнитивной памяти-(2)

Изменение когнитивной памяти мышей изучали с помощью введения антитела #9104 в дозе 50 мг/кг мышам APP/PS1, животной модели болезни Альцгеймера. Так, антитело #9104 вводили тем же способом, что и в Экспериментальном примере б-1, и проводили тесты контекстного и сигнального обусловливания страха с помощью принятого метода, а их результаты показаны на Фиг. 13.

Как показано на Фиг. 13, мыши, которым вводили антитело #9104, демонстрировали значительное увеличение уровня условно-рефлекторного замирания в соответствии с контекстным или звуковым сигналом, но мыши из группы отрицательного контроля демонстрировали снижение уровня замирания.

Результаты показали, что антитело согласно настоящему изобретению значительно улучшает когнитивную память на моделях животных с болезнью Альцгеймера.

Экспериментальный пример 7: Активность белка ASM

7-1. Активность белка ASM

Была исследована активность белка ASM, присутствующего
5 в крови и тканях головного мозга животных моделей, у которых
в Экспериментальном примере 6 было подтверждено улучшение
когнитивной памяти. В частности, белки получали из плазмы
крови мышей с помощью принятого метода, и полученные белки
использовали в качестве образца и подвергали СВЭЖХ тем же
10 способом, что и в Экспериментальном примере 4-1. Результаты,
полученные с помощью расчёта активности белка ASM (%) мышей
контрольной группы, не получавшей лечения, и мышей группы,
которой вводили антитело #9104, относительно активности белка
ASM мышей группы отрицательного контроля, показаны на Фиг.
15 14.

Как показано на Фиг. 14, активность белка ASM,
присутствующего в плазме крови, ингибировалась
приблизительно на 64% при введении антитела #9104.

20 7-2. Уровень белка ASM

Анализ ELISA проводили для изучения того, было ли
подавление активности белка ASM, подтвержденное в
Экспериментальном примере 7-1, обусловлено снижением уровня
экспрессии белка. Ткань плазмы крови, полученную в
25 Экспериментальном примере 7-1, использовали в качестве

образца, и анализ проводили с использованием набора ASM ELISA для мышей (Mybiosource) в соответствии с протоколом производителя. Результаты показаны на Фиг. 15.

Как показано на Фиг. 15, уровень белка ASM был
5 значительно повышен у мышей, которым вводили антитело #9104, а не в контрольной группе без лечения или группе отрицательного контроля.

Результаты показали, что антитело согласно настоящему изобретению ингибирует активность белка ASM, не влияя на
10 уровень белка ASM.

Экспериментальный пример 8: Ингибирование накопления β -амилоида ($A\beta$)

Накопление β -амилоида в тканях мозга животных, у которых
15 в Экспериментальном примере 6 было подтверждено улучшение когнитивной памяти, исследовали с помощью окрашивания тиофлавином-S, вестерн-блоттинга с использованием антитела 6E10 и ELISA.

8-1. Ингибирование накопления $A\beta$ - (1)

Животные модели из Экспериментального примера 6
анестезировали 2,5%-ным раствором авертина и вскрывали
грудную полость для получения крови из сердца с помощью 1-
кубового шприца. После получения крови выполняли перфузию с
25 использованием 20 мл PBS и дополнительную перфузию с

использованием 20–30 мл 4%-ного раствора параформальдегида (PFA). Головной мозг мыши вырезали и оставляли на ночь, помещая в 4%-ный раствор PFA, а затем ткань разрезали на срезы толщиной 30 мкм с помощью вибратора. Полученные срезы
5 ткани головного мозга помещали в 12-луночный планшет, а затем добавляли 1 мл раствора PBS с последующим перемешиванием при 33 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. Раствор PBS удаляли, и бляшки A β окрашивали в течение 10 минут обработкой 500 мкл 0,5%-ного реагента тиофлавина-S,
10 разведённого в этаноле. Затем срезы дважды промывали 50%-ным этанолом и один раз промывали 1 мл раствора PBS. Срезы монтировали путем добавления среды для монтирования, содержащей DAPI.

Для окрашивания всех типов белков A β срезы ткани
15 головного мозга помещали в 12-луночный планшет, и затем добавляли 1 мл раствора PBS с последующим перемешиванием при 33 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре, и затем удаляли раствор PBS. После этого в лунки добавляли по 1 мл раствора PBS, содержащего 0,2% Triton X-100, и
20 перемешивали при 33 об/мин в течение 1 часа. После перемешивания раствор PBS, содержащий Triton X-100, удаляли и срезы предварительно обрабатывали раствором PBS, содержащим 0,05% Triton X-100, в течение 1 часа. К предварительно обработанным срезам ткани головного мозга добавляли смесь
25 антитела 6E10 (Biolegend) и раствора PBS, содержащего 0,05%

Triton X-100, в объёмном соотношении 1:1, в количестве 500 мкл. Срезы инкубировали при 4 °С в течение ночи при перемешивании и трижды промывали раствором PBS, содержащим Triton X-100. Срезы обрабатывали вторичным антимышиным антителом 488, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем промывали три раза раствором PBS, содержащим Triton X-100. Срезы монтировали путем добавления среды для монтирования, содержащей DAPI.

Окрашенные срезы ткани головного мозга визуализировали с увеличением в 20 раз с использованием конфокального микроскопа с лазерным сканированием (FV3000, Olympus), а окрашенную область анализировали с использованием программного обеспечения MetaMorph (Molecular Devices). Результаты анализа показаны на Фиг. 16 и 17.

Как показано на Фиг. 16 и 17, плотные и диффузные бляшки β -амилоида, присутствующие в коре и гиппокампе головного мозга, были значительно уменьшены при введении антитела #9104.

20 8-2. Ингибирование накопления $A\beta$ - (2)

Полученную ткань головного мозга разделяли на кору и гиппокамп и к ней добавляли буфер RIPA, содержащий 100 мМ PMSF и 1% ингибитора протеаз, с последующей гомогенизацией ткани. Гомогенизированные ткани центрифугировали в течение 25 10 минут при 4 °С и 13000 об/мин с получением супернатантов.

Полученные супернатанты далее центрифугировали снова в течение 30 минут при тех же условиях для получения супернатантов, и эти супернатанты использовали в качестве образцов для измерения в них уровней амилоидов A β с использованием набора ELISA для измерения уровня β 40-амилоида (КНВ3481, Invitrogen) и набора ELISA для измерения уровня β 42-амилоидом (КНВ3441, Invitrogen). Полученные результаты показаны на Фиг. 18.

Как показано на Фиг. 18, уровень амилоида A β 40, присутствующего в коре и гиппокампе головного мозга, был снижен на 30,9% и 30,9%, соответственно, с помощью введения антитела #9104, и это снижение было значительным по сравнению с группой отрицательного контроля. Кроме того, уровень A β 42 был значительно снижен при введении антитела #9104 по сравнению с группой отрицательного контроля.

Экспериментальный пример 9: Накопление тау-белка

Срезы ткани головного мозга, полученные в Экспериментальном примере 8, использовали для изучения изменения накопления тау-белка с помощью окрашивания тау-белка. В частности, эксперимент проводили в тех же условиях и тем же способом, что и в Экспериментальном примере 8-1, за исключением того, что в качестве первичного антитела использовали антитело к AT8 (ThermoFisher Scientific, MN1020). Результаты анализа показаны на Фиг. 19.

Как показано на Фиг. 19, уровень тау-белка, присутствующего в коре и гиппокампе головного мозга, был значительно снижен при введении антитела #9104.

5 **Экспериментальный пример 10: Ослабление нейровоспаления**

Эффект ослабления нейровоспаления при помощи антитела #9104 в ткани головного мозга животных моделей, подтвержденный улучшением когнитивной памяти в Экспериментальном примере 6, исследовали с помощью активации
10 микроглии и астроцитов. Эксперимент проводили в тех же условиях и тем же способом, что и в Экспериментальном примере 8-1, за исключением того, что в качестве первичного антитела использовали антитело к Iba-1 (Wako, 019-19941) или антитело к GFAP (Dako, N1506), а в качестве вторичного антитела
15 использовали кроличье вторичное антитело 488. Результаты анализа показаны на Фиг. 20 и 21.

Как показано на Фиг. 20 и 21, экспрессия белков Iba-1 и GFAP, присутствующих в коре и гиппокампе головного мозга, была значительно снижена, и, таким образом, активность
20 микроглии и астроцитов в ткани головного мозга была ингибирована антителом #9104.

Результаты показали, что антитело согласно настоящему изобретению обладает эффектом ослабления нейровоспаления головного мозга.

Экспериментальный пример 11: Токсичность

Токсичность антитела #9104 исследовали следующим способом.

Эксперимент проводили, когда вводили антитело #9104 в
5 Экспериментальном примере 6. В частности, выживаемость
оценивали при помощи визуального наблюдения за движением и
аномальными признаками мышей два раза в неделю, и мышей
взвешивали в один и тот же день и одно и то же время один раз
в неделю. Мышей после завершения эксперимента с введением
10 антитела вскрывали при помощи принятого метода и наблюдали
органы для определения наличия или отсутствия органной
токсичности, вызванной антителом #9104. Результаты изменения
выживаемости и массы тела мышей показаны на Фиг. 22, а
результаты наблюдения органной токсичности показаны на Фиг.
15 23.

Как показано на Фиг. 22 и 23, при введении антитела
#9104 не наблюдали изменений выживаемости и массы тела, а
также было подтверждено, что органы являются нормальными.

Результаты показали, что антитело согласно настоящему
20 изобретению достоверно может быть использовано для лечения
заболевания головного мозга, такого как болезнь Альцгеймера,
даже без проявления токсичности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Фармацевтическая композиция для предотвращения или
лечения заболевания головного мозга, причем указанная
5 фармацевтическая композиция содержит в качестве активного
ингредиента антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
которые специфично связываются с белком кислой
сфингомиелиназы (ASM).

10 2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся
тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий
фрагмент связываются по меньшей мере с одним эпитопом,
выбранным из группы, состоящей из фрагмента, включающего
аминокислоты в положениях с 53 по 72, фрагмента, включающего
15 аминокислоты в положениях с 101 по 123, фрагмента,
включающего аминокислоты в положениях с 135 по 159,
фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 135 по
155, фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с 218
по 228, и фрагмента, включающего аминокислоты в положениях с
20 259 по 269 от N-конца белка ASM.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся
тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий
фрагмент связываются по меньшей мере с одним эпитопом,
25 выбранным из группы, состоящей из полипептидов,

представленных в SEQ ID NO: 68-73, соответственно.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий
5 фрагмент содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1
тяжелой цепи (X_1YX_2MS), состоящий из аминокислотной
последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61, CDR2 тяжелой
цепи ($X_3IX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YYADSVKG$), состоящий из аминокислотной
10 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62, и CDR3
тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из
аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:
27, 30, 33, 36, 39 и 42, соответственно; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1
15 лёгкой цепи ($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$), состоящий из
аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:
63, CDR2 лёгкой цепи ($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$), состоящий из
аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:
64, и CDR3 лёгкой цепи ($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$), имеющий
20 аминокислотную последовательность, приведённую в SEQ ID NO:
65.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, отличающаяся тем, что:
25 каждая из аминокислот из X_1 и X_2 выбрана из группы,

состоящей из аспарагина (Asn), глицина (Gly), серина (Ser), аспарагиновой кислоты (Asp), аланина (Ala) и тирозина (Tyr);

каждая из аминокислот X_3 - X_{10} выбрана из группы, состоящей из глицина, лейцина (Leu), аланина, серина, тирозина, пролина (Pro), аспарагина, лизина (Lys) и изолейцина (Ile);

каждая из аминокислот X_{11} - X_{14} выбрана из группы, состоящей из треонина (Thr), серина, аспарагина, аланина, пролина и тирозина;

каждая из аминокислот X_{15} - X_{18} выбрана из группы, состоящей из тирозина, аланина, аспарагиновой кислоты, серина, аспарагина, гистидина (His), глутамина (Gln) и лизина; и

каждая из аминокислот X_{19} - X_{23} выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты и аспарагина.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где:

X_1 представляет собой аспарагин, глицин, серин или аспарагиновую кислоту;

X_2 представляет собой аланин или тирозин;

X_3 представляет собой глицин, лейцин, аланин или серин;

X_4 представляет собой тирозин или серин;

X_5 представляет собой пролин или тирозин;

X_6 представляет собой аспарагин или глицин;

каждая из аминокислот X_7 и X_8 представляет собой глицин

или серин;

X₉ представляет собой аспарагин или серин;

X₁₀ представляет собой лизин или изолейцин;

X₁₁ представляет собой треонин или серин;

5 X₁₂ представляет собой аспарагин или серин;

X₁₃ представляет собой аланин, пролин, треонин или тирозин;

X₁₄ представляет собой аспарагин, тирозин или серин;

10 X₁₅ представляет собой тирозин, аланин, аспарагиновую кислоту или серин;

X₁₆ представляет собой аспарагиновую кислоту или аспарагин;

X₁₇ представляет собой серин или аспарагин;

X₁₈ представляет собой гистидин, глутамин или лизин;

15 X₁₉ представляет собой глицин или аланин;

X₂₀ представляет собой аланин, серин или треонин;

X₂₁ представляет собой тирозин, серин, аланин или аспарагиновую кислоту;

X₂₂ представляет собой серин или аспарагин; и

20 X₂₃ представляет собой аланин или глицин.

7. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

25 переменную область тяжелой цепи, содержащую

CDR1 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 28, 31, 34, 37 и 40, соответственно,

CDR2 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 26, 29, 32, 35, 38 и 41, соответственно, и

CDR3 тяжёлой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 27, 30, 33, 36, 39 и 42, соответственно; и

вариабельную область лёгкой цепи, содержащую

CDR1 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 46, 49, 52, 55 и 58, соответственно,

CDR2 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 44, 47, 50, 53, 56 и 59, соответственно, и

CDR3 лёгкой цепи, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 и 60, соответственно.

20

8. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжёлой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

25

вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно,

5 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30, соответственно,

 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1,
10 CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно,

 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных
15 последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно,

 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39,
20 соответственно, и

 вариабельной области тяжёлой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно; и

25 вариабельную область лёгкой цепи, выбранную из группы,

состоящей из:

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45,
5 соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48,
соответственно,

10 вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 49, 50 и 51,
соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
15 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54,
соответственно,

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
20 последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57,
соответственно, и

вариабельной области лёгкой цепи, содержащей CDR1, CDR2
и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных
последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60,
25 соответственно.

9. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

5 вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 25, 26 и 27, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из
10 аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 43, 44 и 45, соответственно;

 вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 28, 29 и 30,
15 соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно;

 вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1,
20 CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 31, 32 и 33, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO:
25 49, 50 и 51, соответственно;

вариабельную область тяжёлой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящие из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно;

вариабельную область тяжёлой цепи, состоящую из CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, состоящую из CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 55, 56 и 57, соответственно; или

вариабельную область тяжёлой цепи, состоящую из CDR1, CDR2 и CDR3 тяжёлой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 40, 41 и 42, соответственно, и вариабельную область лёгкой цепи, состоящую из CDR1, CDR2 и CDR3 лёгкой цепи, состоящих из аминокислотных последовательностей, приведённых в SEQ ID NO: 58, 59 и 60, соответственно.

10. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный белок ASM происходит от млекопитающего.

11. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный белок ASM представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, приведённой в SEQ ID NO: 66 или 67.

5

12. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанное заболевание головного мозга представляет собой дегенеративное заболевание головного мозга.

10

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, отличающаяся тем, что при дегенеративном заболевании головного мозга уровень экспрессии или агрегации β -амилоида повышен, либо существует риск превышения нормы.

15

14. Фармацевтическая композиция по п. 12, отличающаяся тем, что указанное дегенеративное заболевание головного мозга представляет собой деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, легкое когнитивное расстройство, церебральную амилоидную ангиопатию, синдром Дауна, амилоидный инсульт, системный амилоидоз, амилоидоз голландского типа, болезнь Ниманна-Пика, старческую деменцию, боковой амиотрофический склероз, спинально-церебеллярную атаксию, синдром Туретта, атаксию Фридриха, болезнь Мачадо-Джозефа, деменцию с тельцами Леви, дистонию, прогрессирующий надъядерный паралич или лобно-височную

25

деменцию.

15. Функциональный оздоровительный пищевой продукт для предотвращения или облегчения заболевания головного мозга, причём указанный функциональный оздоровительный пищевой продукт содержит в качестве активного ингредиента антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с белком ASM.

10 16. Способ предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга, указанный способ включает стадию введения субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с белком ASM.

15 17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с белком ASM, для применения в способе предотвращения, облегчения или лечения заболевания головного мозга.

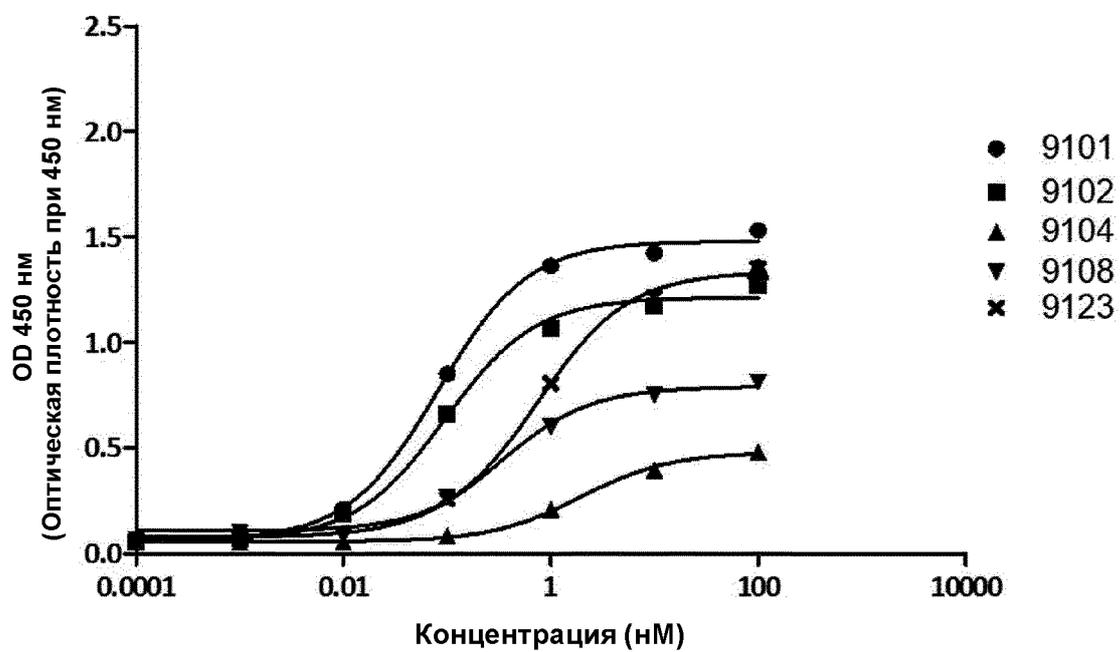
Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжёлой цепи

Антитело	CDR1	CDR2
9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS	WVRQAPGKGLEWVSGIYPNGGNKYADSVKGRF
9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYS	WVRQAPGKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRF
9104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYS	WVRQAPGKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRF
9108	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS	WVRQAPGKGLEWVSAIYPGGGSIYYADSVKGRF
9113	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYS	WVRQAPGKGLEWVSSISPGGSSIIYYADSVKGRF
9123	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMS	WVRQAPGKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRF
	CDR3	
9101	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYRF	-----DYWGQGT
9102	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWHHF	-----DYWGQGT
9104	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTPGF	-----DYWGQGT
9108	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVLGLTPKPF	-----DYWGQGT
9113	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGASLF	-----DYWGQGT
9123	TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRRQCYYDYGM	-----DYWGQGT

Аминокислотная последовательность вариабельной области лёгкой цепи

Антитело	CDR1	CDR2
9101	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSG
9102	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNPVY	WYQQLPGTAPKLLIYANNORPSGVPDRFSGSKSG
9104	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCTGSSSNIGNNAVN	WYQQLPGTAPKLLIYDSDHRPSGVPDRFSGSKSG
9108	QSVLTQPPSASGTPGQRVTLSCITGSSSNIGSNTVY	WYQQLPGTAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSG
9113	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGNNAVS	WYQQLPGTAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSG
9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIISCSGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSG
	CDR3	
9101	TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLNAYV	FGGGTKLTVL
9102	TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDSLSGYV	FGGGTKLTVL
9104	TSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDYSLSAYV	FGGGTKLTVL
9108	TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLSGYV	FGGGTKLTVL
9113	TSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDASLNAYV	FGGGTKLTVL
9123	TSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLGYV	FGGGTKLTVL

2/23
Фиг. 2



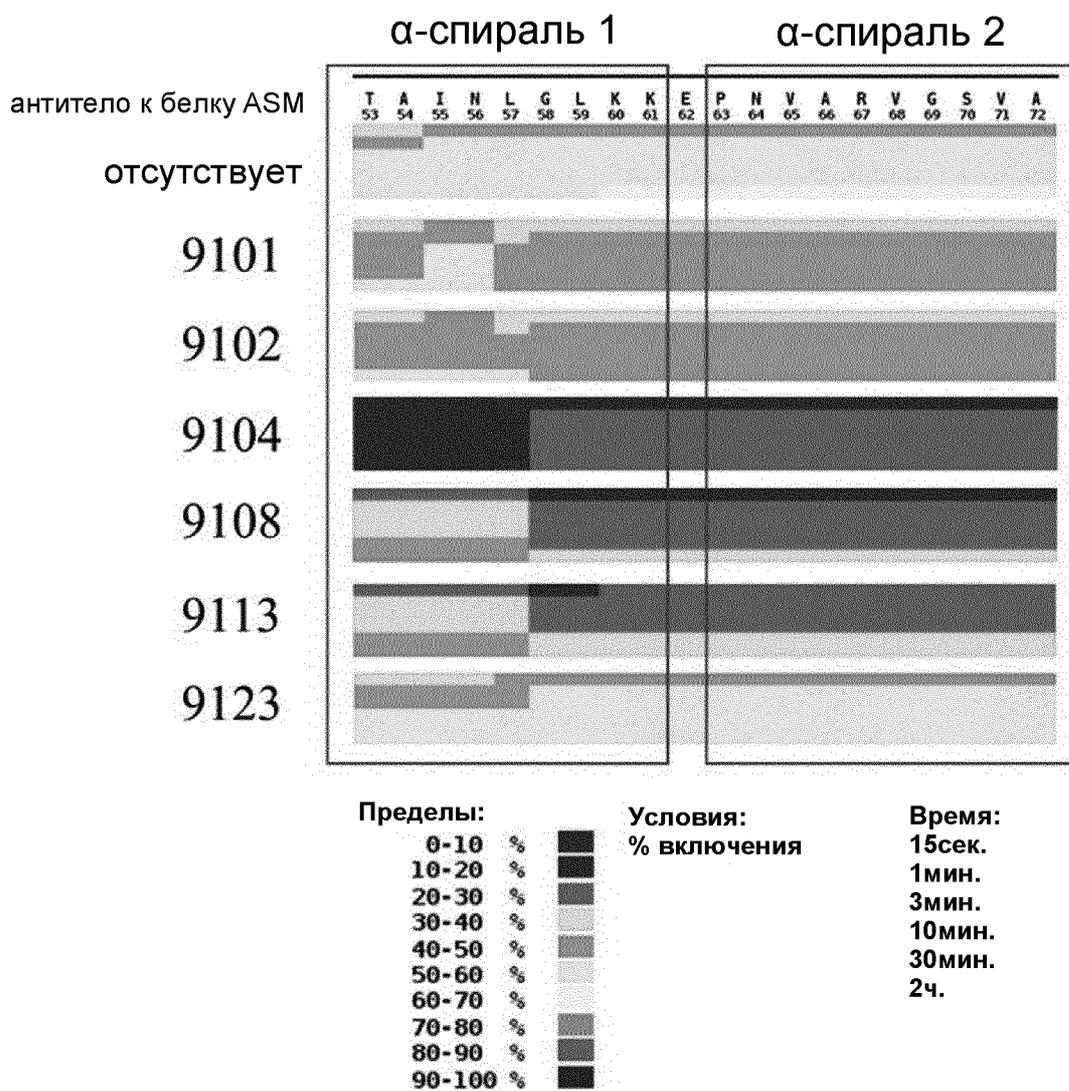
Модель структуры белка ASM человека



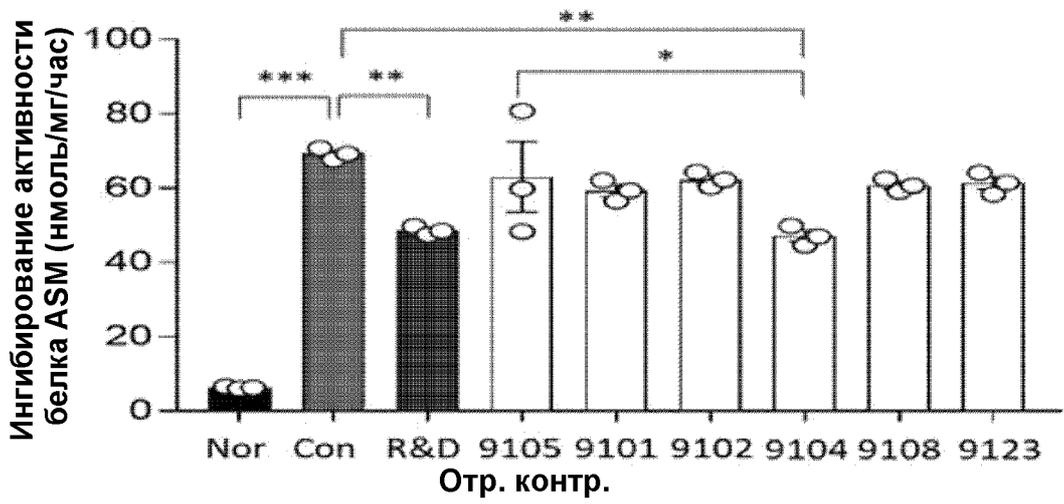
<p>9101 #1: 135-159</p>		<p>9108 #1: 53-72 #2: 135-155 #3: 259-269</p>	
<p>9102 #1: 135-159 #2: 218-228</p>		<p>9113 #1: 53-72 #2: 101-123 #3: 135-155 #4: 259-269</p>	
<p>9104 #1: 53-72 #2: 135-159</p>		<p>9123 #1: 259-269</p>	

■ Участок прогнозированного эпитопа

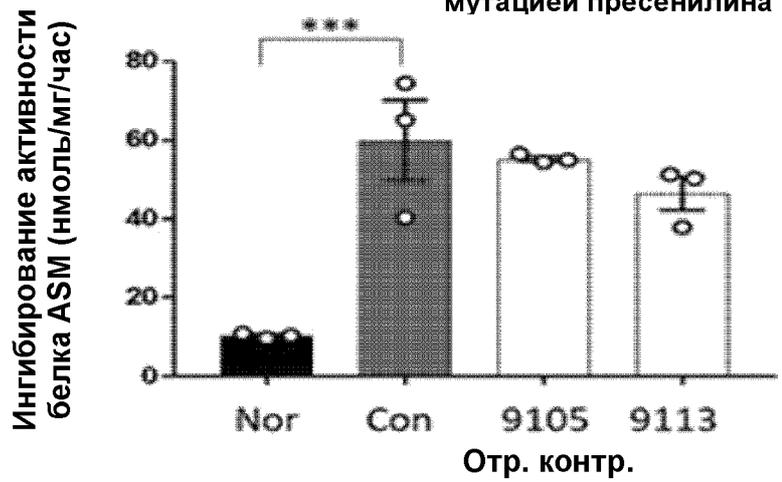
Сапозин-домен



5/23
Фиг. 5

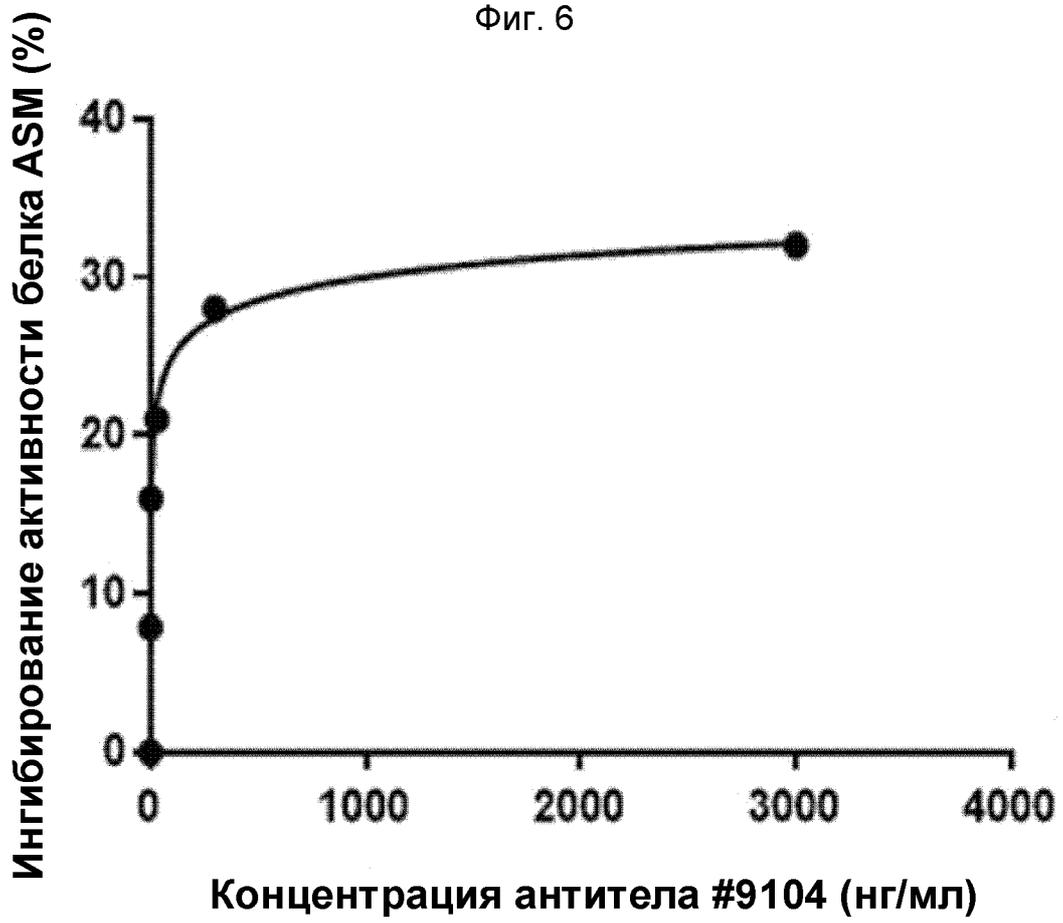


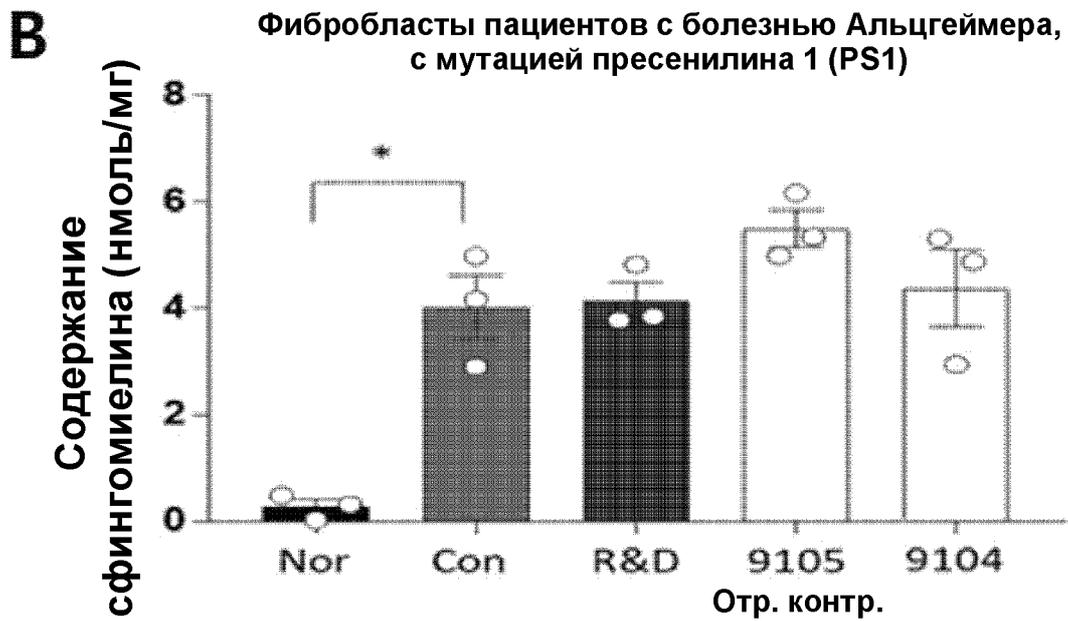
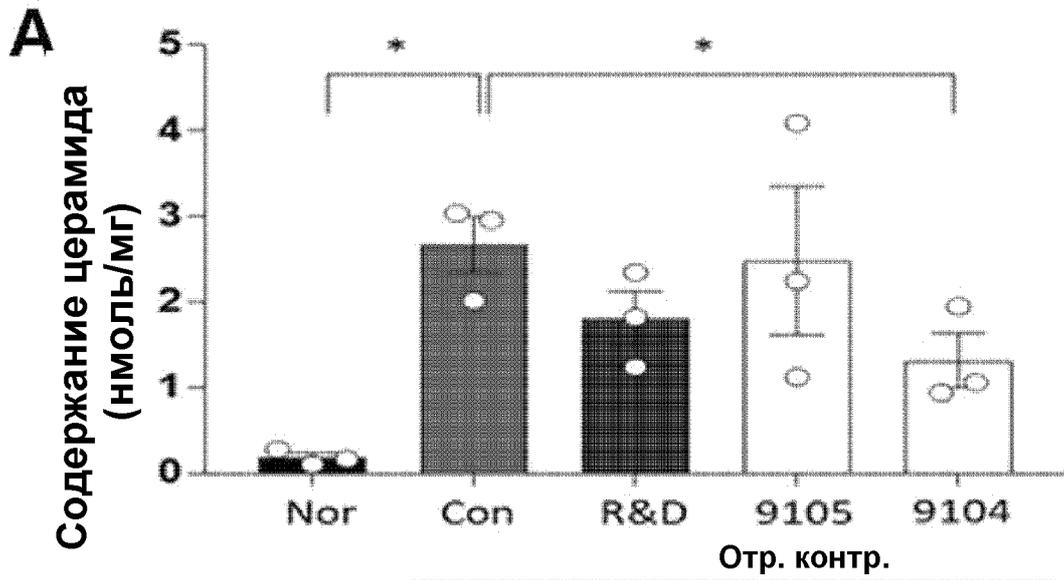
Фибробласты пациентов с болезнью Альцгеймера, с мутацией пресенилина 1 (PS1)



Фибробласты пациентов с болезнью Альцгеймера, с мутацией пресенилина 1 (PS1)

6/23
Фиг. 6



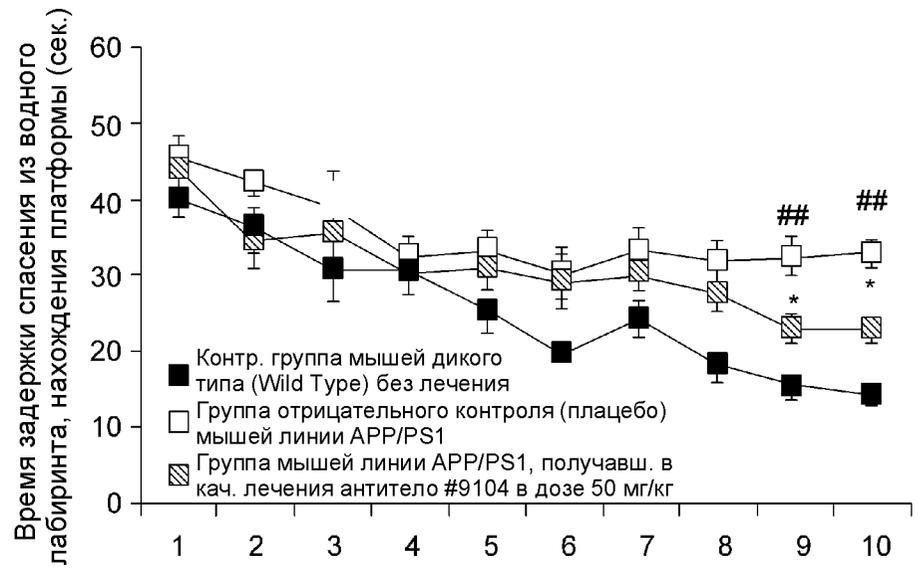


Фибробласты пациентов с болезнью Альцгеймера, с мутацией пресенилина 1 (PS1)

8/23

Фиг. 8





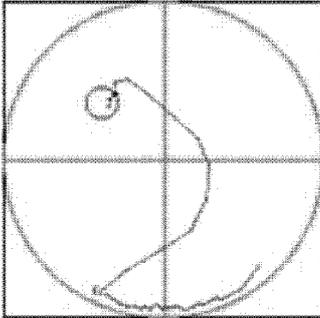
##p<0.01 в сравнении с контрольной группой WT
 *p<0.05 в сравнении с контрольной группой APP/PS1/PBS

9/23
 Фиг. 9

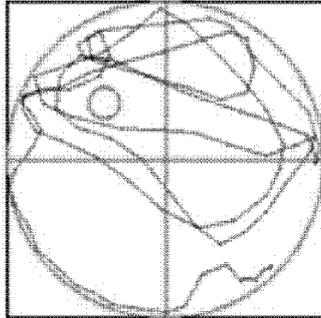
10/23

Фиг. 10

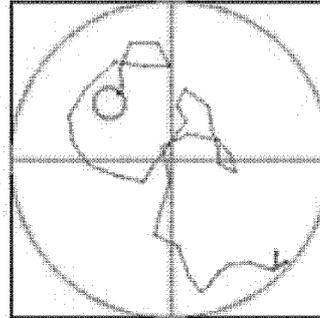
Контрольная группа
мышей дикого типа (Wild
Type) без лечения

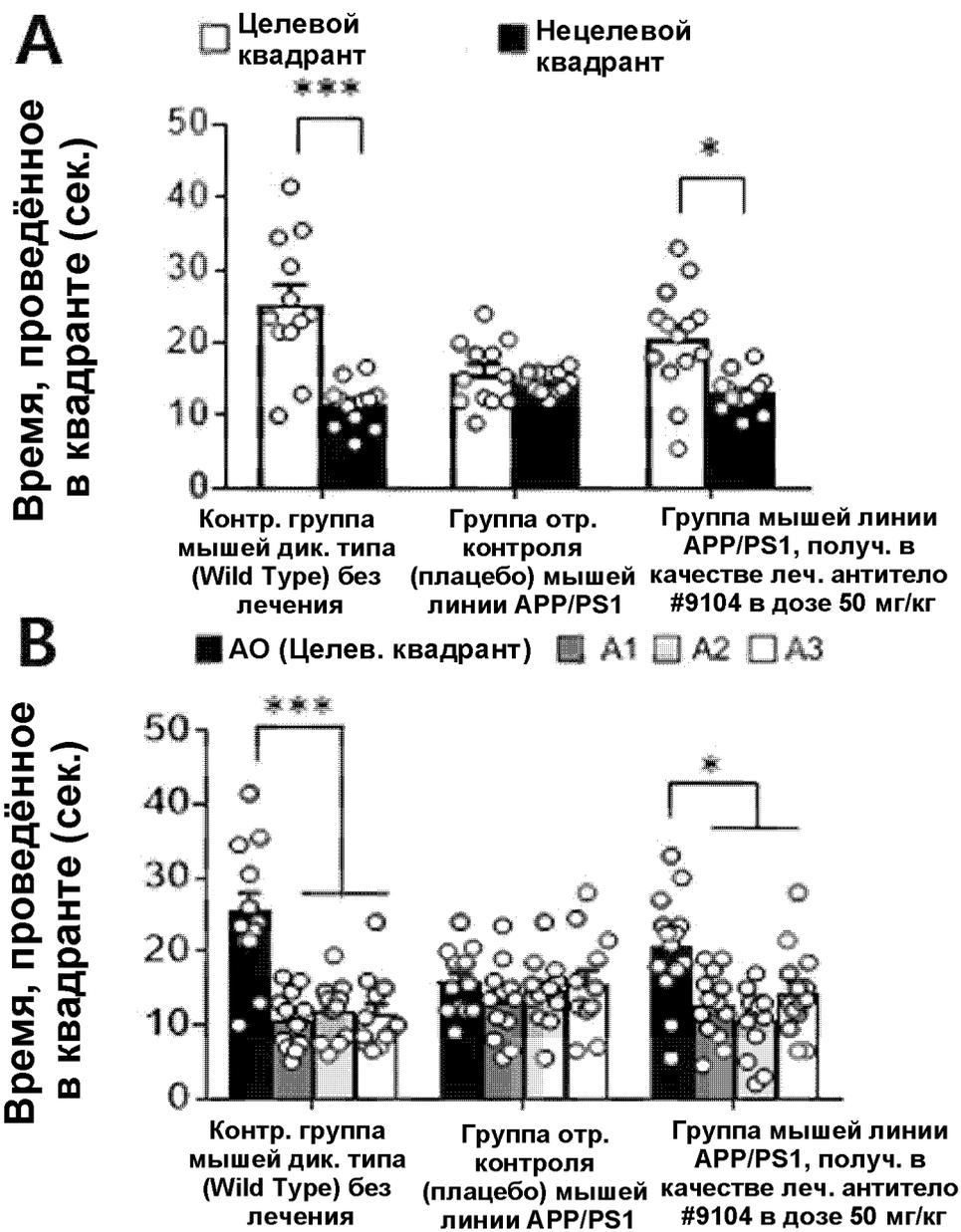


Группа отрицательного
контроля (плацебо)
мышей линии APP/PS1

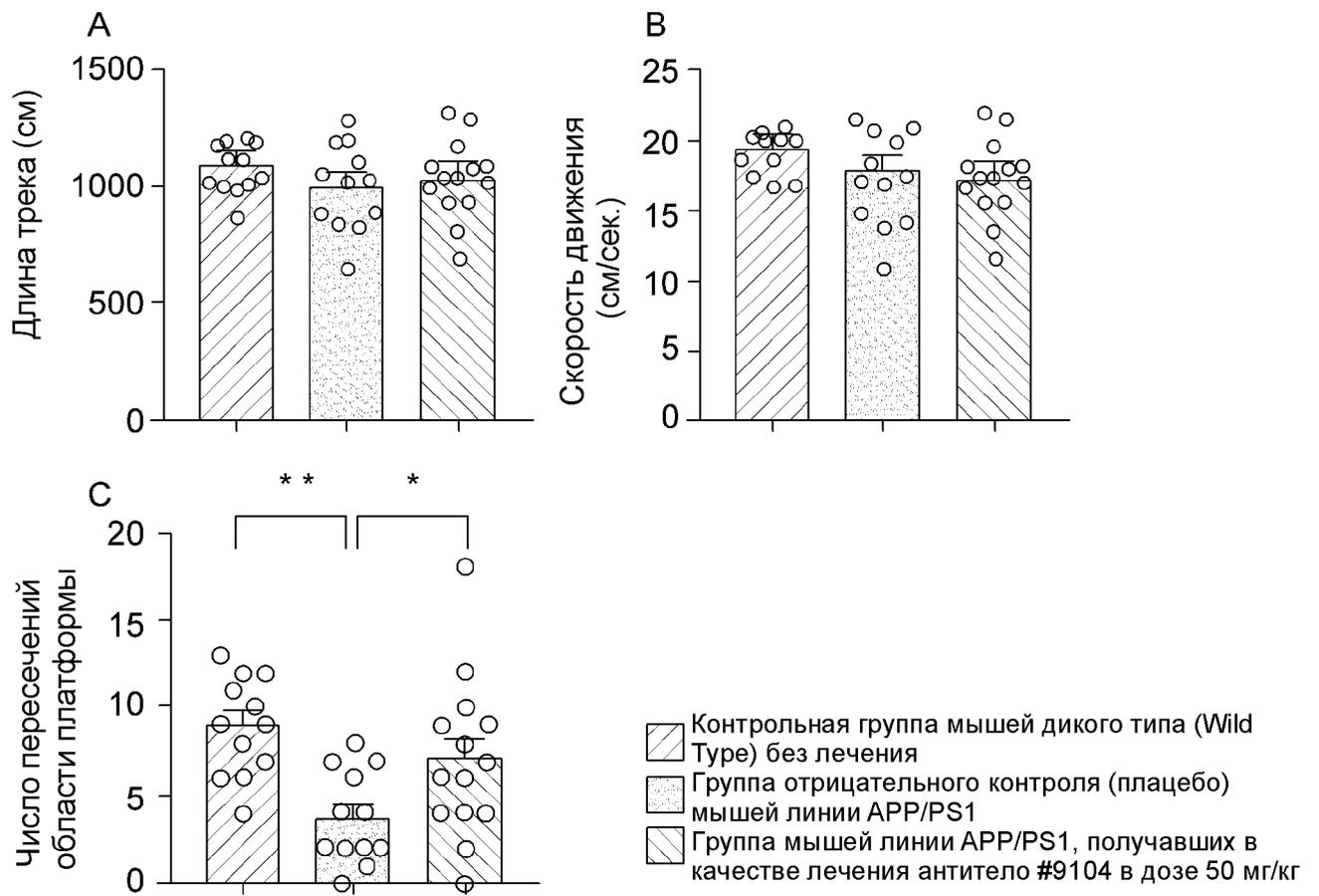


Группа мышей линии
APP/PS1, получавших в
качестве лечения антитело
#9104 в дозе 50 мг/кг

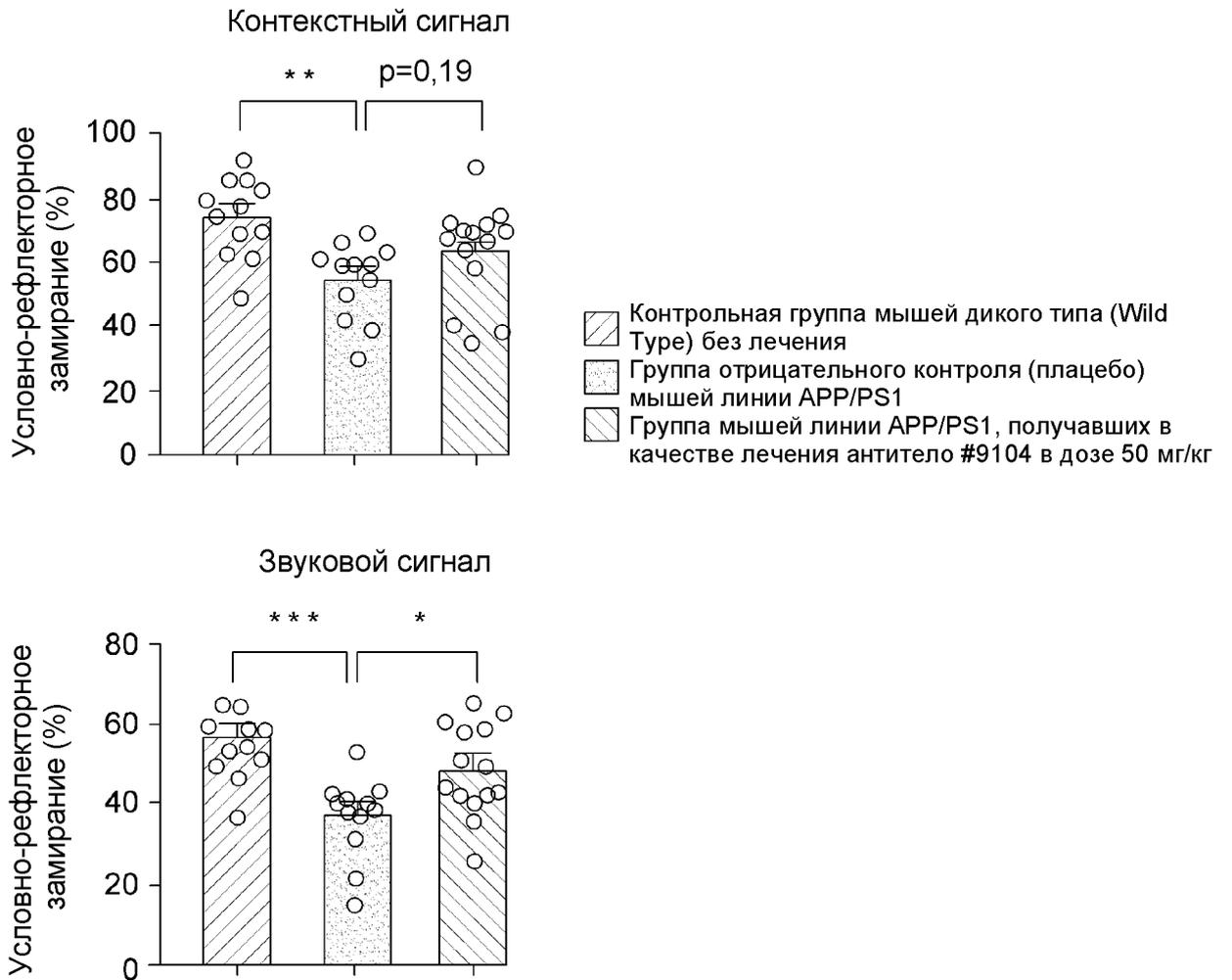




Фиг. 12



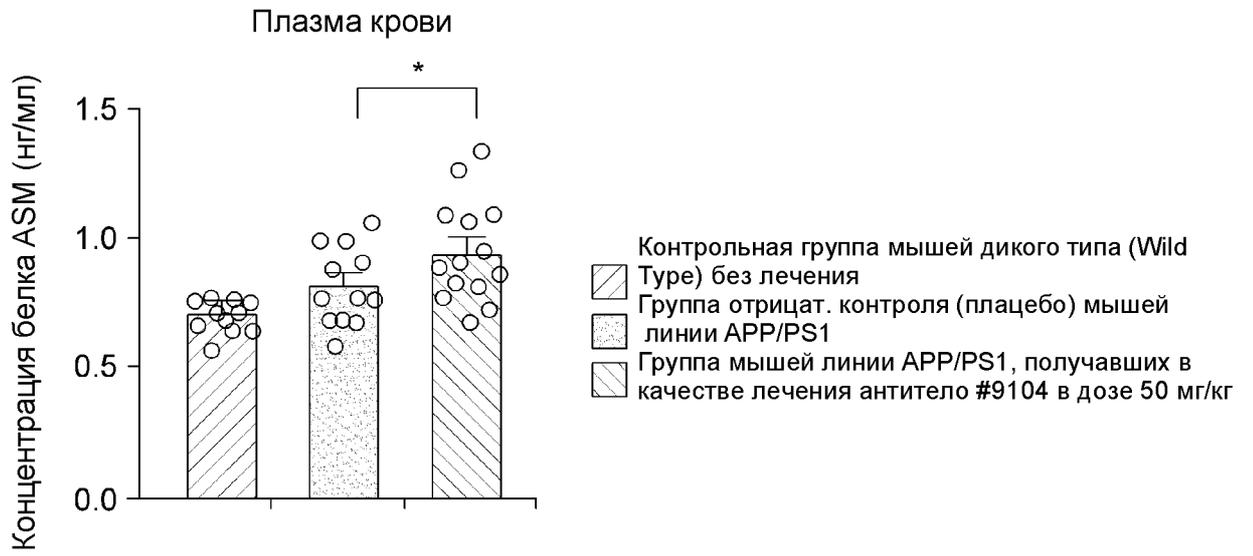
13/23
Фиг. 13

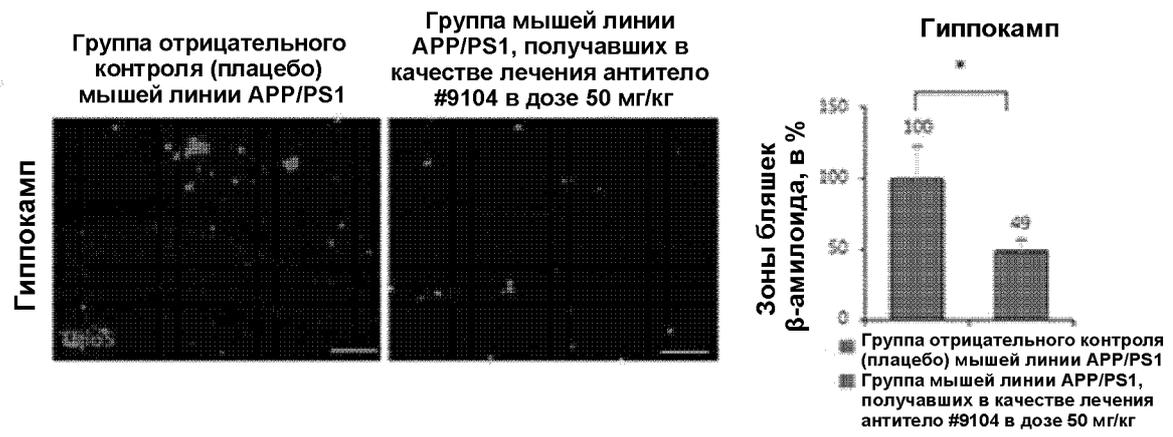
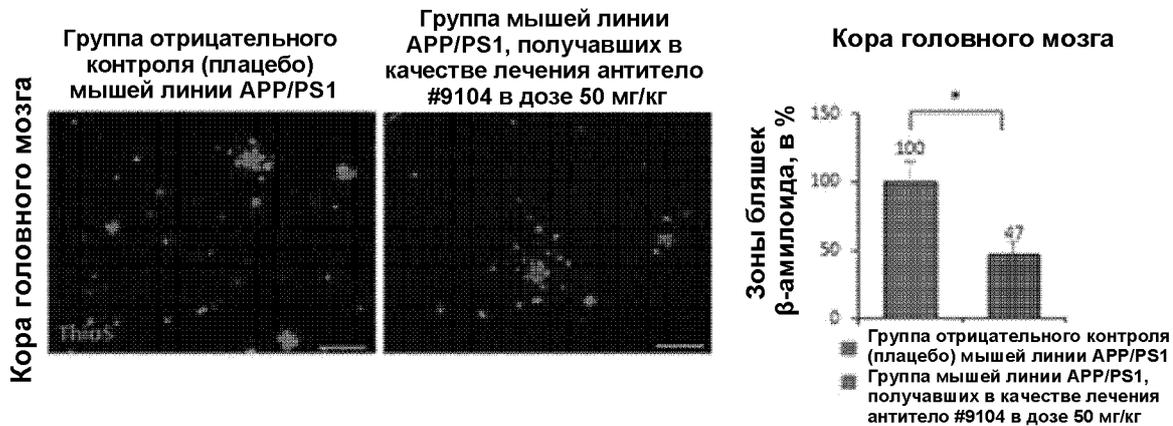


14/23
Фиг. 14

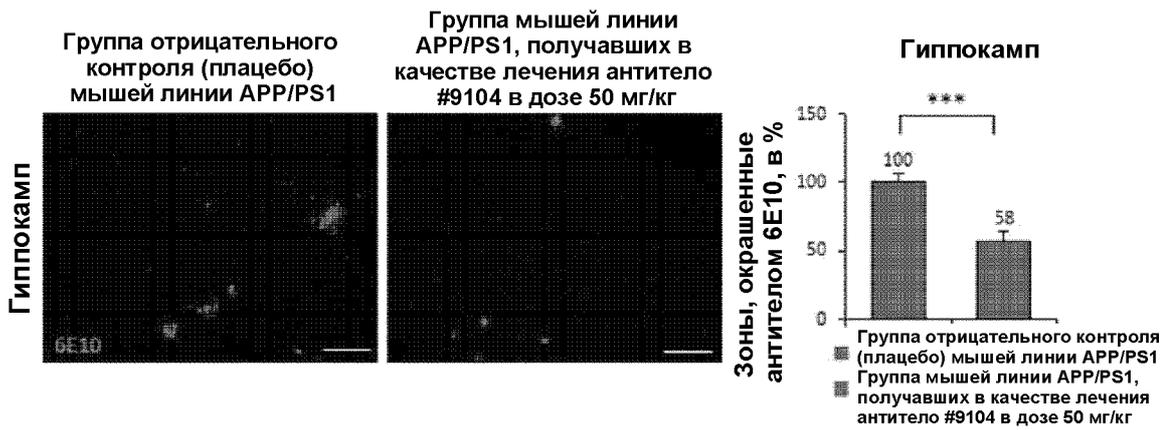
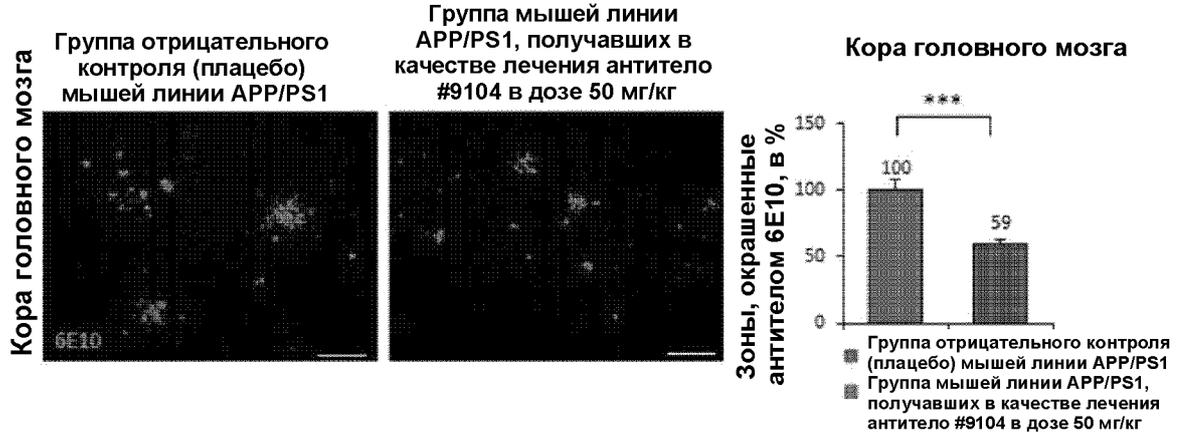


15/23
Фиг. 15



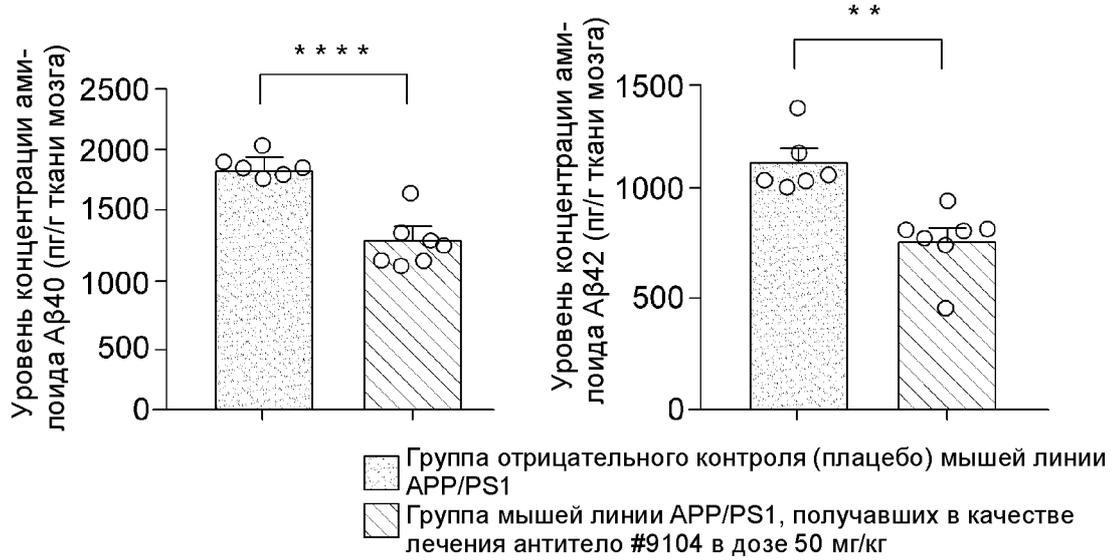


17/23
Фиг. 17

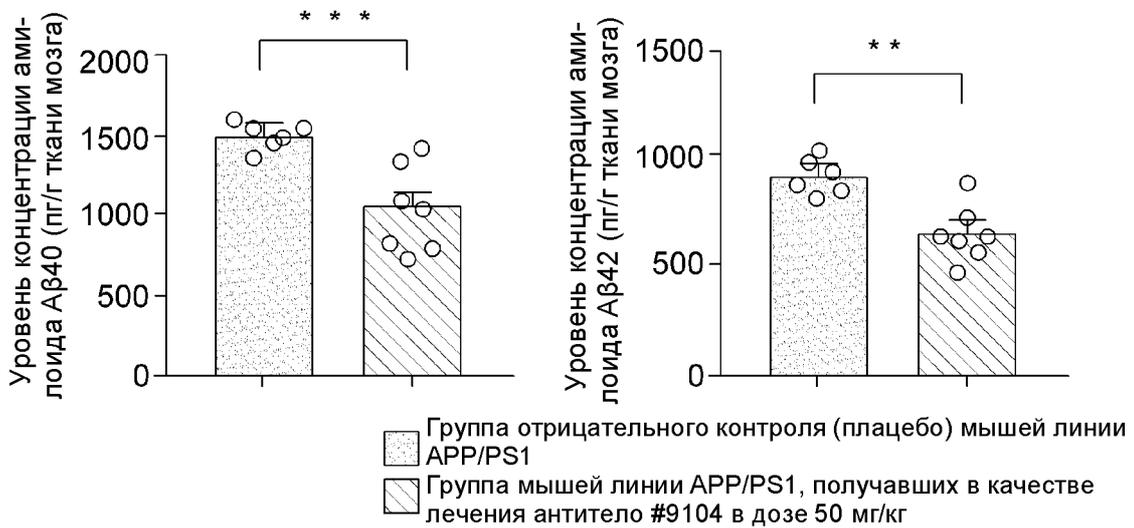


18/23
Фиг. 18

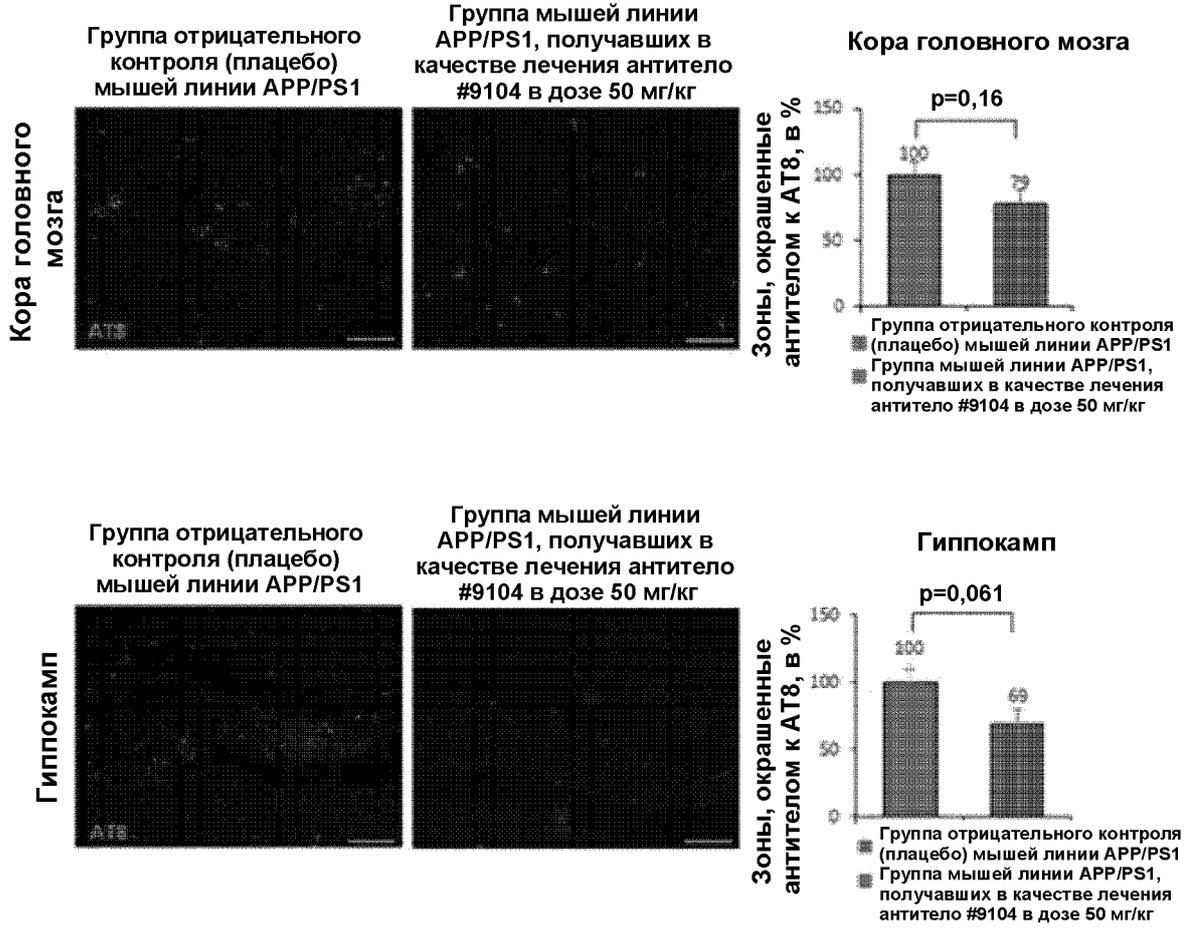
Кора головного мозга



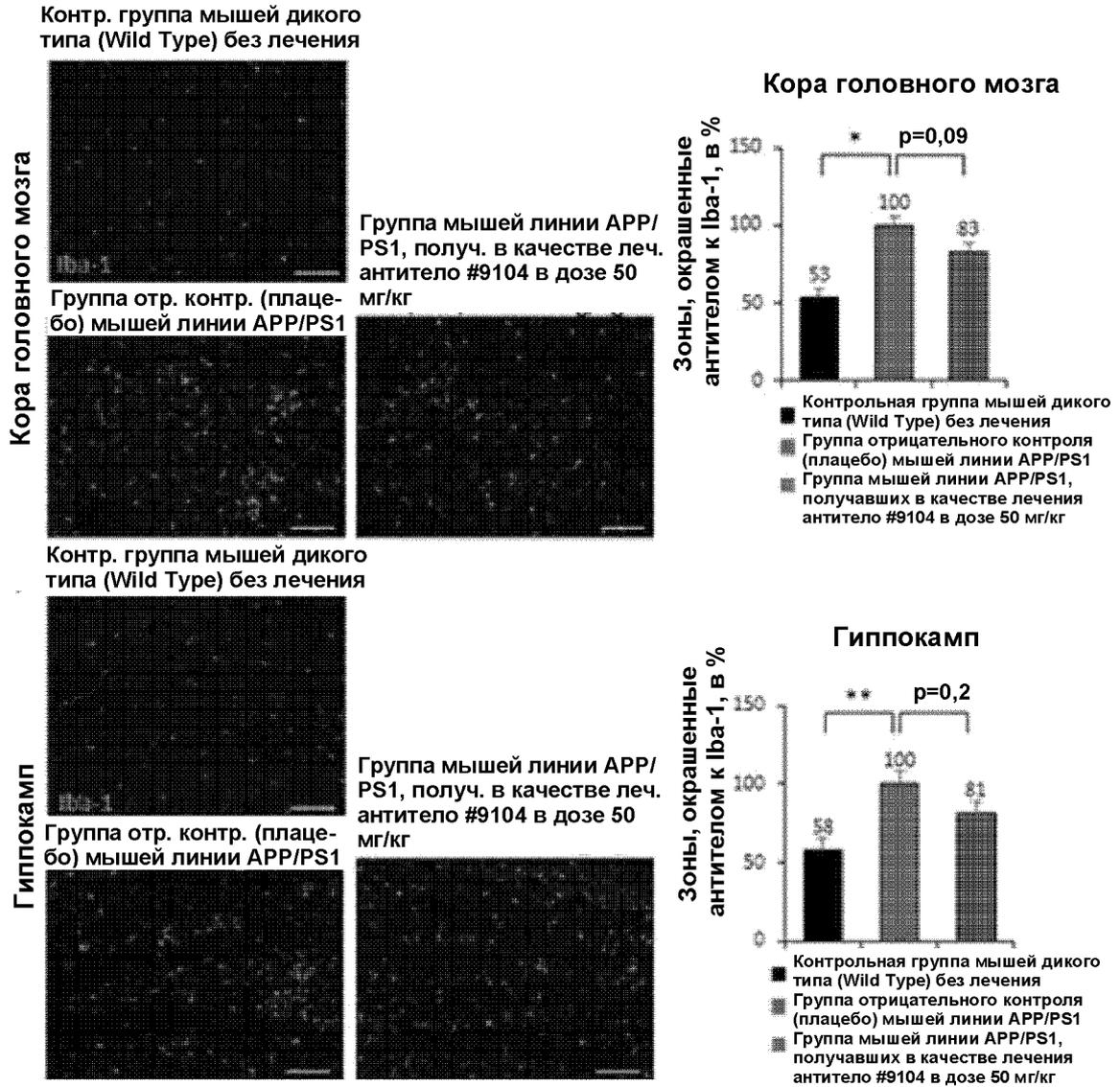
Гиппокамп

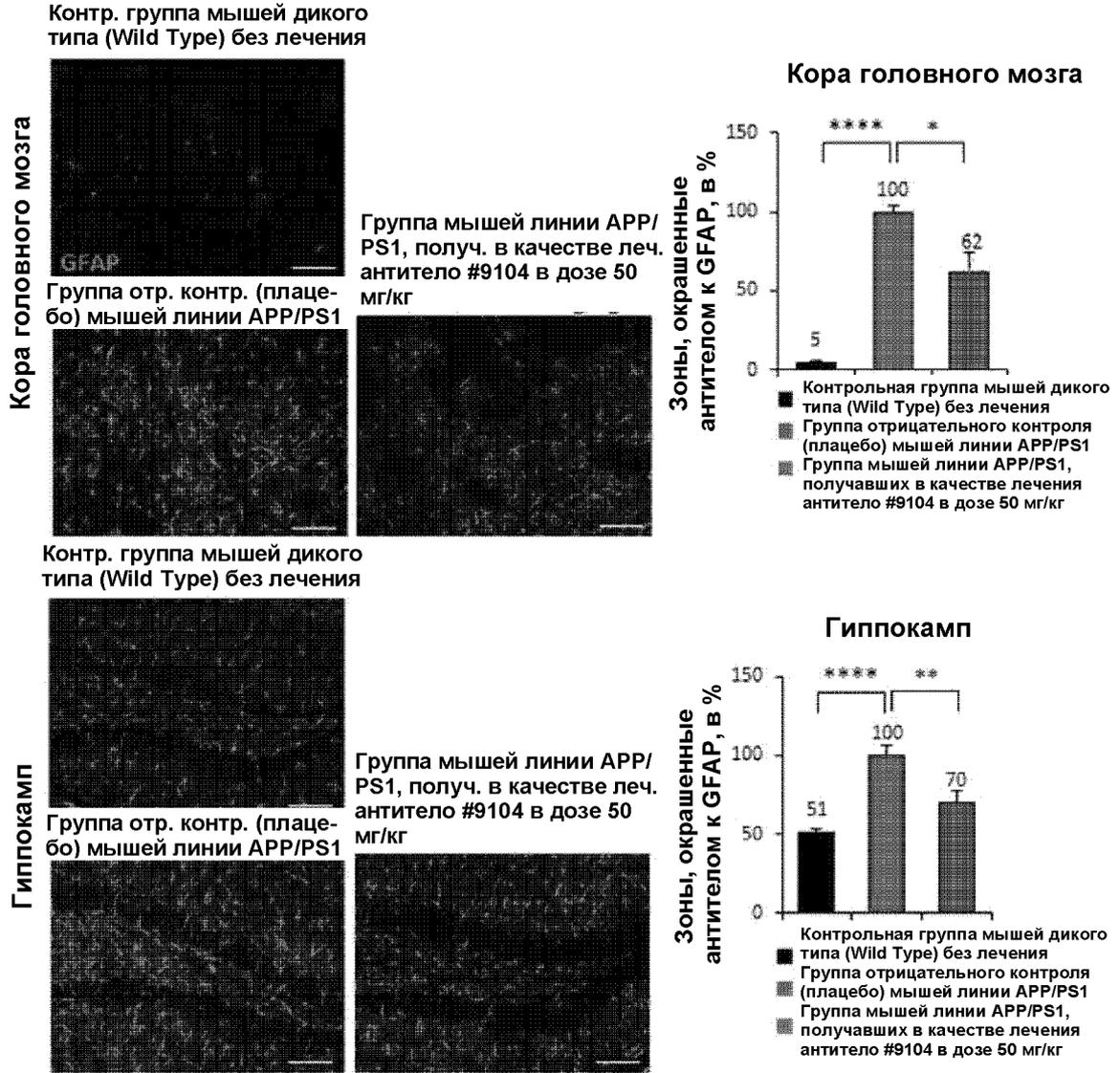


19/23
Фиг. 19

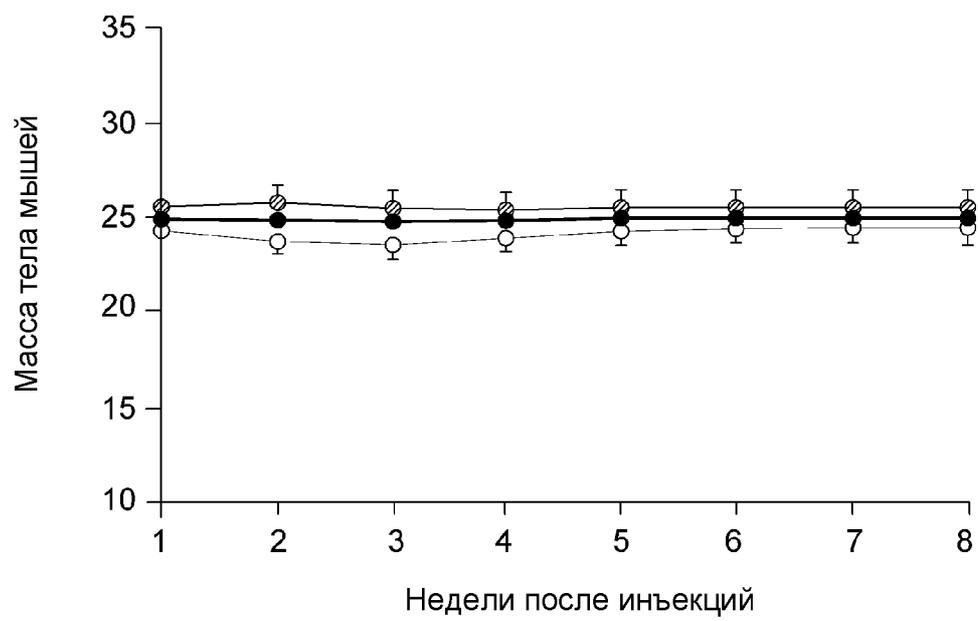
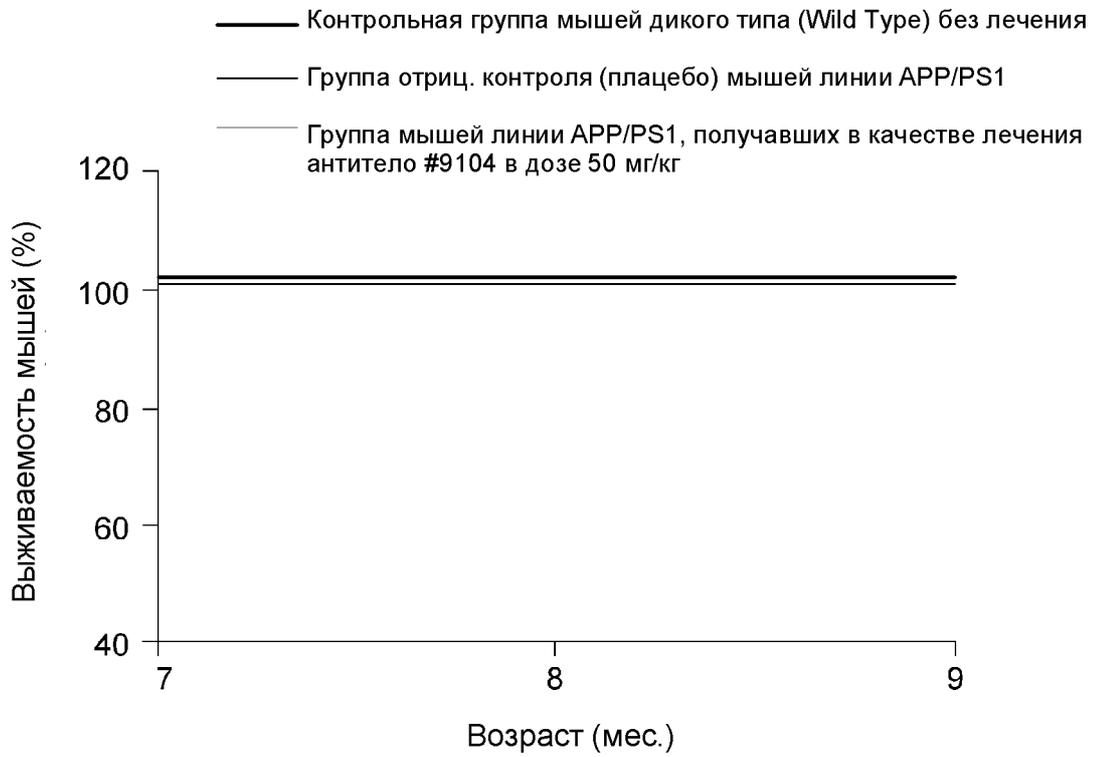


20/23
Фиг. 20

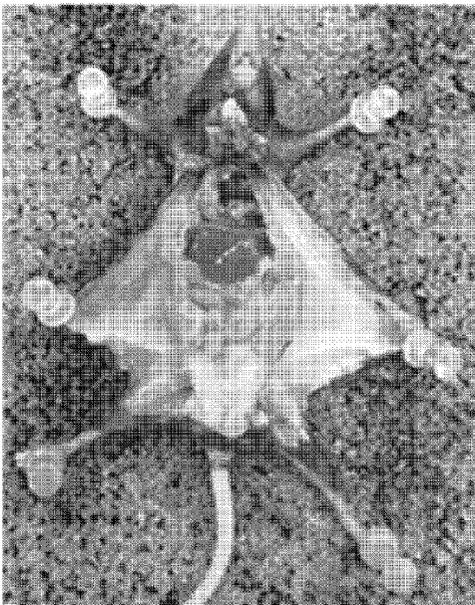




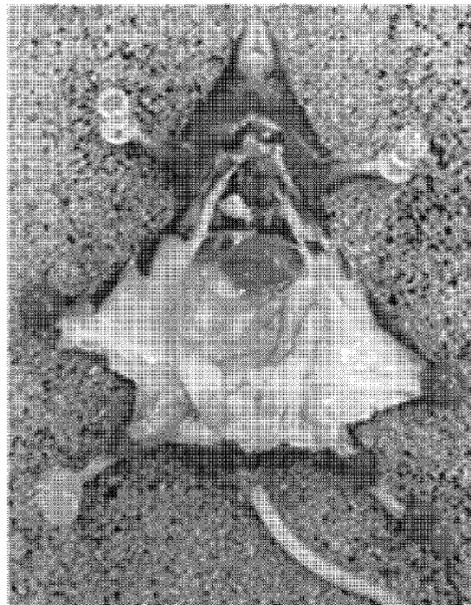
22/23
Фиг. 22



Контрольная группа мышей
дикого типа (Wild Type) без
лечения



Группа отрицательного
контроля (плацебо) мышей
линии APP/PS1



Группа мышей линии APP/PS1,
получавших в качестве лечения
антитело #9104 в дозе 50 мг/кг

