(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037784 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.20

(21) Номер заявки
201891286

(22) Дата подачи заявки
2017.01.10

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИ-БЕТА-АМИЛОИДНЫЙ ПЕПТИД N3pGlu АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/279,268**
(32) **2016.01.15**
(33) **US**
(43) **2018.12.28**
(86) **PCT/US2017/012795**
(87) **WO 2017/123517 2017.07.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Дематтос Рональд Брэдли, Лу Цзижун, Тан Ин (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю., Строкова О.В., Христофоров А.А. (RU)

(56) WO-A2-2012021475
US-A1-2010021478
AU-A1-2014233615

(57) Антитела к N3pGlu Aβ человека, композиции, содержащие такие антитела к N3pGlu Aβ, и способы применения таких антител к N3pGlu Aβ для лечения болезни, характеризующейся отложением Aβ, включая клиническую или доклиническую болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и клиническую или доклиническую церебральную амилоидную ангиопатию.

037784 B1

037784 B1

Данное изобретение относится к антителам, которые связывают бета-амилоидный пептид N3pGlu, и их применению при лечении болезней, связанных с бета-амилоидным пептидом (в данном случае обозначен как Aβ или Abeta).

Расщепление белка предшественника амилоида приводит к образованию пептидов Aβ, которые варьируют в размере от 38 до 43 аминокислот. Превращение Aβ из растворимых в нерастворимые формы с высоким содержанием β-складок и отложение данных нерастворимых форм в виде нейритических бляшек и цереброваскулярных бляшек в головном мозге связано с рядом патологий и болезней, включая болезнь Альцгеймера (AD), синдром Дауна, и церебральную амилоидную ангиопатию (CAA).

Отложения, обнаруженные в бляшках, состоят из гетерогенной смеси пептидов Aβ. N3pGlu Aβ, также упоминаемый как N3pE, pE3-42, или $Aβ_{p3-42}$, представляет собою усеченную форму пептида Aβ и обнаруживается только в бляшках. N3pGlu Aβ не имеет первых двух аминокислотных остатков на N-конце Aβ человека и имеет пироглутамат в третьей аминокислотной позиции, который образовался из глутаминовой кислоты. Несмотря на то, что пептид N3pGlu Aβ является минорным компонентом отложенного в головном мозге Aβ, исследования показали, что пептид N3pGlu Aβ обладает агрессивными свойствами агрегации и накапливается в начале каскада отложения.

Антитела к N3pGlu Aβ являются известными в данной области техники. Например, в патенте США № 8679498 раскрыты человеческие антитела к N3pGlu Aβ (например, B12L) и способы лечения болезней, таких как болезнь Альцгеймера, с помощью указанных антител. Однако по-прежнему существует потребность в антителах к N3pGlu Aβ с более высокой аффинностью, улучшенной термостабильностью, сниженным неспецифическим связыванием и более низкими уровнями иммуногенности. Такие антитела к N3pGlu Aβ обеспечат улучшенный профиль безопасности для потенциального лекарства для человека, с фармакокинетикой для лучшего графика дозирования.

Антитела в пределах объема данного изобретения обладают этими желаемыми характеристиками. Согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, причем указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, причем указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В другом конкретном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, причем указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность LC представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13, и аминокислотная последовательность HC представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В более конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность LC представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность HC представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В другом конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ, содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность LC представляет собой аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 13, и аминокислотная последовательность HC представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В дополнительном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее две LC и две HC, причем аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 12 или 13, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 11. В более конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее две LC и две HC, причем аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 11. В более конкретном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело, содержащее две LC и две HC, причем аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 13, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO:11.

Согласно данному изобретению также предложено антитело к N3pGlu Aβ, содержащее LCVR и HCVR, причем указанная LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и при этом указанная HCVR со-

держит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и в которых аминокислотные последовательности указанных CDR представляют собой SEQ ID NO: 4 для LCDR1, SEQ ID NO: 6 для LCDR2, SEQ ID NO: 7 для LCDR3, SEQ ID NO: 1 для HCDR1, SEQ ID NO: 2 для HCDR2 и SEQ ID NO: 3 для HCDR3.

Согласно данному изобретению дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело по данному изобретению и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей. Дополнительно, согласно данному изобретению предложен способ лечения болезни, характеризующейся отложением Aβ, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по данному изобретению. В частности, согласно данному изобретению предложен способ лечения или профилактики клинической или доклинической болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической CAA, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по данному изобретению. Более конкретно, согласно данному изобретению предложен способ лечения или профилактики патологии, выбранной из продромальной AD (иногда также называемой умеренным когнитивным расстройством, связанным с Aβ, или MCI), легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной доклиничекой болезнью Альцгеймера или клинической болезнью Альцгеймера, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению. Более конкретно, согласно данному изобретению дополнительно предложен способ замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной доклиничекой болезнью Альцгеймера или клинической болезнью Альцгеймера, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению. Более конкретно, согласно данному изобретению дополнительно предложен способ замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ снижения количества бляшек амилоида Aβ в головном мозге у пациента с диагностированной доклинической или клинической болезнью Альцгеймера, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению. Более конкретно, согласно данному изобретению предложен способ снижения количества бляшек амилоида Aβ в головном мозге у пациента с диагностированной патологией, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ предотвращения потери памяти или снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов с низкими уровнями Aβ1-42 в спинномозговой жидкости (СМЖ), или бляшек Aβ в головном мозге, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ лечения бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ лечения бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию PSEN1 E280A, вызывающую болезнь Альцгеймера (мутация Пейса), включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В другом конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ лечения бессимптомных пациентов с генетической мутацией, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ предотвращения потери памяти или снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ предотвращения потери памяти или снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию PSEN1 E280A, вызывающую болезнь Альцгеймера (мутация Пейса), включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В другом конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ предотвращения потери памяти или снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов с генетической мутацией, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному па-

циенту фармацевтической композиции по данному изобретению.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ замедления снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ замедления снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов, которые, как известно, имеют генетическую мутацию PSEN1 E280A, вызывающую болезнь Альцгеймера (мутация Пейса), включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению. В другом конкретном варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ замедления снижения когнитивных функций у бессимптомных пациентов с генетической мутацией, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению.

Согласно данному изобретению также предложено антитело по данному изобретению для применения в терапии. В одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело по данному изобретению для применения в лечении болезни, характеризующейся отложением Aβ. В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело по данному изобретению для применения в лечении клинической или доклинической болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии. В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело по данному изобретению для применения в лечении патологии, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD. В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено антитело по данному изобретению для применения в замедлении снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из клинической или доклинической болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложено антитело по данному изобретению для применения в замедлении снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD.

Дополнительно, данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению для применения в терапии. В одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении болезни, характеризующейся отложением Aβ.

В данном изобретении также предложено применение антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения болезни, характеризующейся отложением Aβ. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено применение антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения клинической или доклинической болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложено применение антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложено применение антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из клинической или доклинической болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложено применение антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для замедления снижения когнитивных функций у пациента с диагностированной патологией, выбранной из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD.

В одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В дополнительном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В дополнительном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В конкретном варианте осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, представляет собой SEQ ID NO: 14, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, представляет собой SEQ ID NO: 15. В конкретном варианте осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, представляет собой SEQ ID NO: 14, а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, представляет собой SEQ ID NO: 16.

Дополнительно согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления, клеточная линия млекопитающего представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO) или клеточную линию эмбриональной почки хомячка (HEK).

Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последова-

тельность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления, клеточная линия млекопитающего представляет собой клеточную линию CHO или HEK.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложен способ получения антитела, содержащего LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и/или ДНК, кодирующую HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше. Согласно данному изобретению также предложен способ получения антитела, содержащего LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 и/или HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше.

В другом варианте осуществления согласно данному изобретению предложен способ получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше. Согласно данному изобретению предложен способ получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, в таких условиях, что антитело экспрессируется, и выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше.

Данное изобретение включает способ получения антитела, которое содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 11, и аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 12, и который включает: a) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, в которых экспрессируется антитело, и b) выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше. Данное изобретение также включает способ получения антитела, которое содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 11, и аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 13, и который включает: a) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, в которых экспрессируется антитело, и b) выделение экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано выше.

Антитела по данному изобретению связываются с N3pGlu Aβ. Последовательность N3pGlu Aβ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Как применяется в данном документе, термин "антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащую две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные между собой дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой LC и HC включает в себя вариабельную область, отвечающую за распознавание антигена посредством содержащихся в ней определяющих комплементарность областей (CDR). CDR перемежаются с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями. Определение принадлежности аминокислот к доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител по данному изобретению основано на хорошо известной конвенции нумерации по Кабату (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), и конвенции нумерации по Норфу (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)). Следуя вышеописанному способу были определены CDR по данному изобретению (табл. 1).

Антитела по настоящему изобретению включают каппа LC и IgG HC. В конкретном варианте осуществления, антитела по данному изобретению представляют собой IgG1.

Антитела по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела ("мАт").

Моноклональные антитела могут быть получены, например, гибридомными методами, рекомбинантными методами, методами фагового дисплея, синтетическими методами, например CDR-

перенесением, или комбинациями таких или других методов, известных в данной области техники. В другом варианте осуществления данного изобретения, антитело или нуклеиновая кислота, кодирующая его, предлагается в выделенной форме. Как применяется в данном документе, термин "выделенный" относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, что не встречается в природе и свободен(на) или практически свободен(на) от других макромолекулярных частиц, обнаруженных в клеточной среде. "По существу свободный", как применяется в данном документе, означает, что белок, пептид или нуклеиновая кислота интереса содержит больше чем 80% (в молярном исчислении) представленных макромолекулярных частиц, предпочтительно больше чем 90% и более предпочтительно больше чем 95%.

После экспрессии и секреции антитела среду фильтруют для удаления клеток, а отфильтрованную среду очищают с применением любого из многих обычно применяемых методов. Очищенное антитело может быть приготовлено в виде фармацевтических композиций в соответствии с хорошо известными способами приготовления белков и антител для парентерального введения, в частности для подкожного, интратекального или внутривенного введения. Антитело может быть лиофилизировано вместе с подходящими фармацевтически приемлемыми наполнителями, а затем снова восстановлено разбавителем на водной основе перед применением. В альтернативном варианте антитело может быть приготовлено в водном растворе и храниться в течение 1-3 лет до применения. В любом случае форма хранения и форма введения фармацевтических композиций антитела будут содержать фармацевтически приемлемый наполнитель или наполнители, которые являются ингредиентами, отличающимися от антитела. Ингредиент является фармацевтически приемлемым в зависимости от его влияния на безопасность и эффективность, или от его влияния на безопасность, чистоту и активность фармацевтической композиции. Если считается, что ингредиент имеет достаточно неблагоприятный эффект на безопасность или эффективность (или на безопасность, чистоту или активность), чтобы обуславливать его неприменение в композиции для введения человеку, то он не является фармацевтически приемлемым для применения в фармацевтической композиции антитела.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по данному изобретению, может быть введена пациенту, который подвержен риску появления или демонстрирующий симптомы, заболевания или патологии, как описано в данном документе, парентеральными путями (например, подкожно, внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно). Предпочтительными являются подкожный и внутривенный пути. Фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит "эффективное" количество антитела по данному изобретению. Эффективное количество обозначает количество, необходимое (в дозах и в течение периодов времени, и для средств введения) для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество антитела может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивида, а также способности антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективное количество может быть легко определено лечащим диагностом или специалистом в области здравоохранения, как специалистом в данной области техники, применяя известные методы и наблюдая эффекты. Частота дозирования зависит от фактической фармакокинетики и фармакодинамики у людей. Продолжительность лечения будет варьировать в зависимости от многих факторов, и она будет определяться диагностом пациента или лечащим врачом на основе опыта и навыков в данной области техники. Частота и продолжительность лечения могут варьировать в зависимости от показаний.

Термины "лечение", "лечить" или "проводить лечение" и т.п. включая ограничение, замедление или остановку прогрессирования, или тяжести существующего симптома, патологии, болезни или нарушения у пациента.

Термин "пациент" относится к человеку.

Термин "профилактика" обозначает профилактическое введение антитела по данному изобретению бессимптомному пациенту или пациенту с доклинической болезнью Альцгеймера для предотвращения прогрессирования заболевания.

Термин "болезнь, характеризующаяся отложением Aβ", представляет болезнь, которая патологически характеризуется отложениями Aβ в головном мозге или сосудистой сети мозга. Это включает болезни, такие как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия. Клинический диагноз, определение стадии или прогрессирование болезни Альцгеймера могут быть легко определены лечащим диагностом или специалистом в области здравоохранения, как специалистом в данной области техники, применяя известные методы и наблюдая результаты. Это, в целом, как правило включает в себя некую форму визуализации бляшек в головном мозге, оценку психоэмоциональных или когнитивных характеристик (например, "Оценка клинической деменции - сводка результатов" (CDR-SB), "Мини-экзамен психоэмоционального состояния" (MMSE) или "Шкала оценки болезни Альцгеймера-Когнитивная" (ADAS-Cog)) или оценку физических функций (например, "Совместное исследование болезни Альцгеймера повседневной активности" (ADCS-ADL). "Клиническая болезнь Альцгеймера", как применяется в данном документе, является диагностированной стадией болезни Альцгеймера. Она включает в себя патологии, диагностированные как продромальная болезнь Альцгеймера, легкая болезнь Альцгеймера, умеренная болезнь Альцгеймера и тяжелая болезнь Альцгеймера. Термин "доклиническая болезнь Альцгеймера" представляет собой стадию, которая предшествует клинической болезни Альц-

геймера, при которой измеряемые изменения по биомаркерах (таких как уровни Aβ42 СМЖ или отложених бляшках в головном мозге, наблюдаемых с помощью ПЭТ (позитронно-эмиссионной томографии) амилоида) указывают на самые ранние признаки пациента с патологией Альцгеймера, прогрессирующей в клиническую болезнь Альцгеймера. Обычно это стадия до появления симптомов, таких как потеря памяти и замешательство.

Нижеследующие примеры и анализы показывают, что антитела по данному изобретению полезны для лечения болезни, характеризующейся отложением Aβ, такой как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и CAA. Следует, однако, понимать, что нижеследующие примеры изложены в качестве иллюстрации, а не ограничения, и что различные модификации могут быть сделаны специалистом в данной области техники.

Примеры

Экспрессия и очистка сконструированных антител к N3pGlu Aβ

Антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению могут быть экспрессированы и очищены по существу следующим образом. Вектор экспрессии с глутамин синтетазой (ГС), содержащий последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 12 или 13, и последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 11, применяют для трансфекции клеточной линии яичника китайского хомяка (CHO) путем электропорации. Вектор экспрессии кодирует ранний промотор SV (вирус обезьян 40E) и ген ГС. После трансфекции клетки подвергают массовому отбору с помощью 0-50 мкМ L-метионинсульфоксимина (MSX). Клетки массового отбора или мастер-клетки затем размножают в безсывороточных суспензионных культурах, которые будут применятся для производства.

Отфильтрованную среду, в которую секретировалось антитело, наносят на аффинную колонку с белком A, которая была уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) (pH 7,4). Колонку промывают 1 M NaCl для удаления неспецифически связывающихся компонентов. Связанное антитело к N3pGlu Aβ элюируют, например, цитратом натрия при pH (примерно) 3,5 и фракции нейтрализуют 1 M Tris-буфером. Проводят обнаружение фракций антитела к N3pGlu Aβ, например, с помощью SDS-PAGE или аналитической эксклюзионной хроматографии, а затем их объединяют. Антитело к N3pGlu Aβ по данному изобретению концентрируют либо в PBS при pH 7,4, либо в 10 мМ буфере цитрата натрия, 150 мМ NaCl при pH около 6. Конечный материал может быть стерильно отфильтрован с применением общепринятых методов. Чистота антитела к N3pGlu Aβ составляет больше чем 95%. Антитело к N3pGlu Aβ по данному изобретению может быть немедленно заморожено при -70°C или храниться при 4°C в течение нескольких месяцев. Ниже приведены аминокислотные SEQ ID NO для иллюстративных антител по данному изобретению.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных антител к N3pGlu

SEQ ID NO антитела				
Антитело	**Легкая цепь**	**Тяжелая цепь**	**LCVR**	**HCVR**
I	12	11	9	8
II	13	11	10	8

SEQ ID NO антитела			
Антитело	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
I	4	6	7
II	4	5	7

SEQ ID NO антитела			
Антитело	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**
I and II	1	2	3

Аффинность и кинетика связывания

Аффинность и кинетику связывания антитела к N3pGlu Aβ с пептидом pE3-42 Aβ или пептидом Aβ 1-40 измеряют поверхностным плазмонным резонансом, применяя Biacore® 3000 (GE Healthcare). Аффинность связывания измеряют путем захвата антитела к N3pGlu Aβ иммобилизованным белком A на чипе CM5 Biacore® и пропусканием пептида pE3-42 Aβ или пептида Aβ 1-40, начиная с 100 нМ с 2-кратным серийным разведением до 3,125 нМ. Эксперименты проводят при 25°C в буфере HBS-EP (GE Healthcare BR100669, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4).

Для каждого цикла антитело захватывают введением 5 мкл раствора антитела с концентрацией 10 мкг/мл, с скоростью потока 10 мкл/мин. Пептид связывают введением 250 мкл при 50 мкл/мин и затем диссоциируют в течение 10 мин. Поверхность чипа регенерируют введением 5 мкл глицинового буфера

при pH 1,5 при скорости потока 10 мкл/мл. Данные сопоставляют с моделью связывания Лангмюра 1:1 для получения k_{on}, k_{off} и для вычисления K_D. В соответствии с процедурами, описанными выше, наблюдали следующие параметры (показаны в табл. 2).

Таблица 2. Аффинность и кинетика связывания

Антитело	**k_{on} (x10^{5}1/М х сек)**	**k_{off}(x10^{-4}1/сек)**	**K_D (нМ)**
I	1,39	1,31	0,71
II	3,63	1,28	0,35

Не обнаружено заметного связывания с Aβ 1-40, что указывает на то, что антитело I и антитело II связаны специфически с пептидом pE3-42 Aβ по сравнению с Aβ 1-40.

Термостабильность

Для определения стабильности антитела в стрессовых условиях (то есть при повышенной температуре и низком pH) отфильтрованные среды, содержащие антитело по данному изобретению, доводят до pH 7,4 или pH 5,0 с помощью PBS или 100 мМ цитрата натрия соответственно. Образцы плотно закрывают и инкубируют при 65°C в течение 60 мин, а затем охлаждают на льду. Белковые агрегаты в образцах осаждают центрифугированием, а прозрачные супернатанты переносят на новую плашку и нейтрализуют до pH 7,4 путем 50-кратного разбавления в буфере PBS. Активность связывания антигена (pE3-42) измеряют и рассчитывают по отношению к образцу, не подвергавшемуся воздействию стрессовых условий, для определения процента оставшейся активности.

В соответствии с процедурами, описанными выше, были получены следующие данные.

Таблица 3. Процент антигенсвязывающей активности после стрессовых условий

Антитело	**pH 7,4 (%)**	**pH 5,0 (%)**
I	Не определено	60,2
II	91,6	71,2
B12L	62,1	11,1

Как показано в табл. 3, антитело I и антитело II обладают повышенной термостабильностью по сравнению с B12L.

Связывание с мишенью ex vivo

Для определения связывания мишени ex vivo на срезах головного мозга из фиксированного мозга PDAPP иммуногистохимический анализ проводят с экзогенно добавленными антителами к N3pGlu Aβ по данному изобретению. Серийные фронтальные криосрезы из старых мышей PDAPP (25-месячный возраст) инкубируют с 20 мкг/мл иллюстративного антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению (антитело I или антитело II). Применяют вторичные реагенты HRP, специфические к IgG человека, и отложенные бляшки визуализируют с помощью DAB-Plus (DAKO). В качестве положительного контроля применяют биотинилированное мышиное антитело 3D6 с последующей стадией добавления вторичного антитела HRP. Положительное контрольное антитело (биотинилированное 3D6) пометило значительные количества отложенного Aβ в гиппокампе PDAPP, а иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению пометили разновидность отложений. Данные гистологические исследования показали, что иллюстративные антитела N3pGlu Aβ по данному изобретению связывают мишень - отложенный Aβ ex vivo.

Фагоцитоз ex vivo

Анализ фагоцитоза ex vivo проводят для исследования того, могут ли антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению (антитело I или антитело II) способствовать микроглиальному фагоцитозу бляшки. Замороженные срезы головного мозга человека с Альцгеймером (20 мкм) предварительно инкубируют с 10 мкг/мл иллюстративного антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению или контролями в течение 1 ч при 37°C в 24-луночных плашках. На одну обработку приходится четыре лунки. Затем добавляют первичные клетки микроглии мыши (8×10^5, C57/BL6) и инкубируют в течение 24 ч. Ткани в каждой лунке денатурируют в 5,2 М гуанидиновом буфере и содержание $A\beta_{1-42}$ оценивают с помощью ИФА. Поскольку содержание Aβ может варьировать среди множества срезов, для каждой тестовой лунки вводят контроль в виде сестринского среза, а содержимое тестовой лунки нормируют по отношению к тому же сестринского среза.

По сравнению с положительными контрольными образцами, иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению значительно уменьшили $A\beta_{1-42}$. Отрицательные контрольные образцы имели незначительный клиренс отложенного $A\beta_{1-42}$. Поэтому анализ фагоцитоза ex vivo показывает, что иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению могут устранять бляшку ex vivo посредством фагоцитоза.

Связывание с мишенью in vivo

Измеряют способность антител N3pG по данному изобретению проходить гематоэнцефалический

барьер и связываться с отложенной бляшкой in vivo. Восемнадцатимесячным трансгенным мышам PDAPP вводят внутрибрюшинные инъекции с антителом к N3pGlu Aβ (антитело I или антитело II) или с IgG отрицательного контроля. Шесть мышей в группе получают одну 40 мг/кг инъекцию антитела в 1-й день и в 3-й день. Связывание с мишенью in vivo определяют на 6-й день, когда мышей умерщвляют и головной мозг собирают для гистохимического анализа.

Степень связывания с мишенью in vivo определяют количественно как процент площади, положительной по связыванию антителом к N3pGlu Aβ in vivo, нормированной к общей площади бляшек, как определено иммуноокрашиванием экзогенным 3D6 на сестринских срезах (соотношение ТЕ). Соотношение ТЕ получают путем измерения процента площади, связанной антителом, и нормирования значения к общему проценту площади возможной мишени (общее количество отложенного Aβ, визуализированного экзогенной иммуногистохимией с помощью положительного контрольного антитела (3D6) на сестринском срезе).

Следуя процедурам, по существу, как описано выше, иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению продемонстрировали связывание с мишенью in vivo в гиппокампе, и в ограниченной степени в коре, тогда как животные, которым вводили контрольный IgG, не имели никакого окрашивания, специфичного для бляшек. Соотношения ТЕ составляли 1,95% (антитело I) и 3,65% (антитело II).

Аналогичное исследование проводят с антителом II на мышах PDAPP в среднем в возрасте от 24 до 26 месяцев. Антитела II имело соотношение ТЕ, равное 9,41%.

Данные результаты показали, что антитело I и антитело II, когда они вводятся периферически, могут проникать сквозь гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с отложенным Aβ.

Удаление бляшек in vivo

Исследования проводят с применением химерных суррогатных антител с LCVR и HCVR антитела II, слитых с константной областью каппа мыши и IgG2a Fc, для оценки удаления бляшек in vivo у старых мышей PDAPP. Старым мышам PDAPP (от 22 до 24 месяцев, n = 23 в группе) вводят подкожно один раз в неделю в течение 7 недель 12,5 мг/кг химерного антитела II или контрольного IgG. Контрольных старых мышей PDAPP (умерщвленных в начале исследования) применяют для оценки уровней ранее существовавшего отложения до терапевтического лечения.

По завершении исследования конечные уровни лекарственного средства измеряют в плазме, и головные мозги оценивают с помощью ИФА для определения уровней $A\beta_{1-42}$. Старые мыши PDAPP имеют максимальное количество бляшек, что подтверждается несущественным дальнейшим накоплением $A\beta_{1-42}$ в течение 7-недельного периода лечения контрольным IgG. Группа антитела на основе химерного антитела II показывает значительное снижение $A\beta_{1-42}$ (23%, p = 0,0174) по сравнению с контролем. Уровень экспонирования антитела измеряли в конце 7-недельного периода дозирования, и антитело II имело уровень 31 мкг/мл. Данное исследование показало, что иллюстративные химерные антитела к N3pGlu Aβ способны снижать количество бляшек ($A\beta_{1-42}$) in vivo.

Анализ EpiScreen пролиферации Т-лимфоцитов ex vivo

Анализ EpiScreen™ ex vivo Т-лимфоцитов человека применяют для измерения активации (пролиферации, секреции цитокинов) CD4+ Т-лимфоцитов человека в ответ на иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению (антитело I и антитело II). Для EpiScreen™ используют образцы из 50 здоровых доноров, которые лучше всего представляют количество и частоту аллотипов HLA-DR и DQ, установленных в европейской/североамериканской и мировой популяциях. В анализ включают два положительных контроля: гуманизированное A33, клиническое контрольное антитело, которое демонстрирует высокий уровень иммуногенности в клинике (73%) и обычно вызывает 20-30% ответа Т-лимфоцитов в анализе EpiScreen, и KLH (гемоцианин фиссуреллы), митогенподобный белок, содержащий неоантигены. В анализ также включают отрицательный контроль в виде контрольного буфера.

Процент пролиферации Т-лимфоцитов рассчитывают из среднего значения всех положительных ответов доноров, наблюдаемых во время курса (дни 5-8). Процент пролиферации Т-лимфоцитов составлял 20 и 98% для положительных контролей A33 и KLH соответственно. Процент пролиферации Т-лимфоцитов составлял 14, 6 и 8% для B12L, антитела I и антитела II соответственно. Эти данные показывают, что иллюстративные антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению имеют уменьшенную частоту ответов Т-лимфоцитов по сравнению с положительным контролем и B12L.

Неспецифическое связывание

Изучают антитела к N3pGlu Aβ по данному изобретению на неспецифическое связывание с живыми клетками CHO с помощью проточной цитометрии (FACS) и неспецифического связывания с сывороточным альбумином человека, фибронектином и ЛПНП человека с помощью анализов, которые используют метод Meso Scale Discovery (MSD), которые обеспечивают высокочувствительные, точные и правильные результаты в широком динамическом диапазоне.

Чтобы обнаружить неспецифическое связывание с живыми клетками CHO, выполняют анализ FACS. Антитела к N3pGlu Aβ (антитело I, антитело II или B12L) разводят до 200 мкг/мл в FACS-буфере + 0,1% BSA. Вторичное RPE-меченное F(ab')2 анти-IgG человека (H + L) антитело осла разводят до 20 мкг/мл в FACS-буфере + 0,1% BSA. Клетки CHO центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин, а

затем промывают FACS-буфером + 0,1% BSA. Клетки ресуспендируют до 4 × 10^6 клеток/мл в буфере FACS + 0,1% BSA и 55 мкл клеточной суспензии добавляют в лунки 96-луночной плашки. Вторичное антитело смешивают с антителом к N3pGlu Aβ в равном объеме и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Смесь антител (55 мкл) добавляют к суспензии клеток и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Каждый образец запускают в дупликатах. Плашки центрифугируют, супернатант удаляют и клетки ресуспендируют в 75 мкл буфера FACS + 0,1% BSA. Плашки снова центрифугируют и клетки ресуспендируют в 110 мкл FACS-буфера + 0,1% BSA. В каждую лунку добавляют 1,1 мкл красителя окрашивающего живые клетки (Sytox Blue), и смешивают перед анализом FACS. Активность связывания клеток измеряют с помощью анализа FACS с применением инструмента LSRFortessa™ FACS (BD Biosciences).

Чтобы обнаружить неспецифическое связывание с сывороточным альбумином человека, фибронектином и ЛПНП человека, применяют анализ MSD. Плашки (MSD Multiarray 96-луночная плашка: MSD каталожный номер L15XA-3) покрывают 30 мкл/лунка белком покрытия (20 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4 °C. Белки покрытия могут представлять собой раствор ЛПНП (липопротеин, низкая плотность, из плазмы человека, Sigma-каталожный номер L7914), фибронектин из бычьей плазмы (Sigma-каталожный номер F1141) или HSA (5 мг/мл, Sigma-каталожный номер A8763). Плашки промывают 3 раза PBS + 0,1% Tween-20, блокируют в течение 1 ч в PBS + 0,5% BSA и затем промывают. В лунки добавляют антитело I или антитело II (50 мкг/мл, разбавленное в PBS + 0,5% BSA). Каждую лунку запускают в дупликатах. Плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч и затем промывают. MSD SULFO-TAG античеловеческое антитело (MSD, каталожный номер R32AJ-5) разбавляют до 1 мкг/мл PBS + 0,5% BSA и 50 мкл добавляют в каждую лунку. Плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч и затем промывают. Буфер MSD для считывания (MSD, каталожный номер R92TC-3) разбавляют водой 1:4 для получения рабочего раствора 1× и к каждой лунке добавляют 150 мкл. Плашки считывают и вычисляют средний сигнал.

В соответствии с процедурами, описанными выше, были получены следующие данные.

Таблица 4. Профиль неспецифического связывания

Антитело	CHO (СИФ)	Альбумин (ЭХЛС)	Фибронектин (ЭХЛС)	ЛПНП (ЭХЛС)	Общий балл
I	107	1,686	1,512	2,972	6,277
II	110	1,722	2,757	2,805	7,394
B12L	287	10,140	76,055	18,617	105,099

СИФ = средняя интенсивность флуоресценции;

ЭХЛС = электрохимиолюминесцентный свет

Данные в табл. 4 показывают, что антитело I и антитело II имеют уменьшенное неспецифическое связывание с живыми клетками CHO, сывороточным альбумином человека, фибронектином и ЛПНП человека, по сравнению с B12L.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает N3pGlu Aβ человека, содержащее вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

2. Антитело по п.1, содержащее легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

3. Антитело по п.1, содержащее две LC и две HC, причем аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 12 и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 11.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-3 и один или больше фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

5. Применение антитела по любому из пп.1-3 для лечения болезни, характеризующейся отложением Aβ.

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