



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.08

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

(21) Номер заявки
201890313

(22) Дата подачи заявки
2016.07.15

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К ПИРОГЛУТАМАТНОМУ ВАРИАНТУ БЕТА-АМИЛОИДА

(31) 62/193,356; 62/209,650

(32) 2015.07.16; 2015.08.25

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/EP2016/066924

(87) WO 2017/009459 2017.01.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОБАЙОДРАГ АГ (DE)

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

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

(56) WO-A2-2010009987
WO-A1-2012136552

OLIVER WIRTHS ET AL.: "Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases", JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION;

BASIC NEUROSCIENCES, GENETICS AND IMMUNOLOGY, PARKINSON'S DISEASE AND ALLIED CONDITIONS, ALZHEIMER'S DISEASE AND ADOLESCENT PSYCHIATRY RELATED DISORDERS, BIOLOGICAL PSYCHIATRY, BIOLOGICAL CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIAT, vol. 117, no. 1, 13 October 2009 (2009-10-13), pages 85-96, XP019783126, ISSN: 1435-1463

ACERO G. ET AL.: "Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Abeta-specific antibodies produced in rabbits", JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 213, no. 1-2, 18 August 2009 (2009-08-18), pages 39-46, XP002605076, ISSN: 0165-5728, DOI:10.1016/J.JNEUROIM.2009.06.003 [retrieved on 2009-07-09], cited in the application

YAGHOUB SAFDARI ET AL.: "Antibody humanization methods - a review and update", BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS, vol. 29, no. 2, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 175-186, XP055250530, GB ISSN: 0264-8725, DOI:10.1080/02648725.2013.801235

(57) Изобретение относится к гуманизированным антителам, которые связываются с эпитопом на N-конце пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида (A β N3pE), и к профилактическому и терапевтическому лечению заболеваний и состояний, которые связаны с накоплением и отложением амилоидных пептидов, таких как амилоидоз, группа нарушений и аномалий, ассоциированных с пироглутаматным вариантом амилоидного пептида, таких как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия и другие связанные аспекты. Более конкретно оно относится к применению гуманизированных моноклональных антител для связывания пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида в плазме крови, головном мозге и спинномозговой жидкости для предупреждения накопления или для регрессии отложения A β N3pE в головном мозге и в различных тканях на периферии и для облегчения состояния при амилоидозе. Кроме того, настоящее изобретение относится к диагностическим анализам для проведения диагностики амилоидоза с применением гуманизированных антител по настоящему изобретению.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые связываются с эпитопом на N-конце пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида (A β N3pE), и к профилактическому и терапевтическому лечению заболеваний и состояний, которые связаны с накоплением и отложением амилоидных пептидов, таких как амилоидоз, группа нарушений и аномалий, ассоциированных с пироглутаматным вариантом амилоидного пептида, таких как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия и другие связанные аспекты. Более конкретно оно относится к применению гуманизированных моноклональных антител для связывания пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида в плазме крови, головном мозге и спинномозговой жидкости для предупреждения накопления или для регрессии отложения A β N3pE в головном мозге и в различных тканях на периферии и для облегчения состояния при амилоидозе. Кроме того, настоящее изобретение относится к диагностическим анализам для проведения диагностики амилоидоза с применением гуманизированных антител по настоящему изобретению.

Уровень техники

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

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

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

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

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

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

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

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

Большинство Аβ-пептидов, отложившихся в диффузных бляшках, имеют N-концевое усечение или модификацию. Исследования Piccini и Saido показали, что основная структура сенильных бляшек и сосудистых отложений на 50% состоит из модифицированных пироглутаматом (pyroGlu) пептидов (Piccini et al., *J Biol Chem.* 2005 Oct 7; 280(40):34186-92; Saido et al., *Neuron.* 1995 Feb; 14(2): 457-66). Пептиды, модифицированные pyroGlu, являются в большей степени пиротоксичными по сравнению с другими видами Аβ и устойчивы к аминопептидазам (Russo et al., *J Neurochem.* 2002 Sep; 82(6): 1480-9). Таким образом, виды pyroGlu-Аβ имеют более длительный период полужизни, в результате чего накопление этих видов и образование нейротоксических олигомеров, а также агрегатов, является преимущественным (Saido, *Neurobiol Aging.* 1998 Jan-Feb; 19(1 Suppl):S69-75). Из-за циклизации глутамата до pyroGlu будут утрачиваться заряженные аминокислоты, что резко уменьшает растворимость пептида и вызывает повышенную склонность к агрегации. Исследования *in vitro* показали, что исходная олигомеризация, например Аβ3(pE), проходит намного быстрее по сравнению с немодифицированными пептидами (Schilling et al., *Biochemistry.* 2006 Oct 17; 45(41): 12393-9). Аβ-пептиды N3pE-42 существуют совместно с Аβ-пептидами 1-40/1-42 (Saido, T.C. et al., Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Abeta N3pE, in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)) и на основании ряда наблюдений может играть заметную роль в патогенезе AD. Например, было показано, что охарактеризованная определенная нейротоксичность Аβ-пептидов N3pE-42 (Russo, C. et al., Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides-AbetaN3(pE)-strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002) и pE-модификация N-усеченных Аβ-пептидов придает устойчивость к разрушению большинством аминопептидаз, а также Аβ-разрушающими эндопептидазами (Russo, C. et al., Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides-AbetaN3(pE)-strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002); Saido, T.C. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol. Aging* 19, S69-S75 (1998)). Циклизация глутаминовой кислоты до pE приводит к потере N-концевого заряда, что ускоряет агрегацию Аβ N3pE по сравнению с немодифицированными Аβ-пептидами (He, W. & Barrow, C.J. The Abeta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities *in vitro* than full-length A beta. *Biochemistry* 38, 10871-10877 (1999); Schilling, S. et al., On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (*in vitro*). *Biochemistry* 45, 12393-12399 (2006)). Таким образом, восстановительный процесс в структуре Аβ N3pE-42 должен нарушать устойчивость пептидов, делая их более доступными для деградации и, в свою очередь, предотвратит образование более высокомолекулярных агрегатов Аβ и повысит выживаемость нейронов.

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

Все факты свидетельствуют о том, что pyroGlu Аβ является своего рода зародышем для инициализации образования фибрилл. В другом исследовании (Piccini et al., 2005, выше) добровольцев с отложениями бляшек, но без специфической патологии AD, можно было отличить от пациентов с AD по характерному количеству А(3-видов. Таким образом, количество модифицированных pyroGlu пептидов с N-концевым усечением было значительно выше в головном мозге пациентов с AD.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

заболеванием пожилых людей, при котором уровень β -амилоида также повышен.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Однако существует необходимость в гуманизированных антителах со специфичностью к Аβ-пептидам N3pE, которые можно использовать в лечении человека и которые оказывают положительный эффект на амилоидоз, в частности на когнитивные функции при заболеваниях и состояниях, в которые может быть вовлечен Аβ N3pE, таких как клиническая или доклиническая стадия болезни Альцгеймера, синдром Дауна и клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии.

Краткое описание изобретения

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

В частности, настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его функциональному варианту, где переменная часть легкой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLLX₁SDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLX
 2YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCVQGTTHFPFTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 7),

где

X₁ выбран из Y и H и

X₂ выбран из A, I и T;

или аминокислотной последовательности, выбранной из

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSDGNTYLHWYQQKPKGKAPKLLI
 YKVSNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGT
 KVEIK (SEQ ID NO: 28) и

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIY
 VVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCVQGTTHFPFTFGGGT
 KVEIK (SEQ ID NO: 36),

и/или

где переменная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKKSGASVKVSCASGYSFTGX₃TMNWVRQAPGQGLEWMG
 LINPX₄NX₅VTRYNQKFX₆GRVTX₇X₈RDTSTTTVX₉MELTSLTSEDTA₁₀YYCT
 REAKREWDETYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 17);

где

X₃ выбран из Y и H;

X₄ выбран из Y и S;

X₅ выбран из G, T, A и E;

X₆ выбран из K и Q;

X₇ выбран из L и I;

X₈ выбран из I и T;

X₉ выбран из Y и H и

X₁₀ выбран из V и T;

или аминокислотной последовательности, выбранной из

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGLEWVSFIS
 NLAYSIIYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYVCARYDYDNI
 LDYVMDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 32) и

QVQLVESGAEVKKKPGASVKVSCASGYIFNNYWINWVRQAPGQGLEWMGQI
 YPGDGDNTYNGKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA₁₀VVYVCAREGYIV
 YWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 40).

Настоящее изобретение предусматривает гуманизированные антитела или их фрагменты, которые

оказывают положительное влияние на заболевания и состояния при амилоидозе, в которые может быть вовлечен Аβ N3pE.

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

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

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

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформированным векторами или включающим полинуклеотиды, которые экспрессируют гуманизированные антитела или их фрагменты.

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

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению гуманизированных антител и их фрагментов, применимых для связывания и выведения или удаления Аβ N3pE у людей, и таким образом для диагностики, профилактики и лечения заболеваний и состояний, характеризующихся амилоидозом или токсичностью Аβ N3pE.

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

Введение гуманизированных антител по настоящему изобретению, включая их иммунологически реакционноспособные фрагменты, может привести к выведению или удалению Аβ N3pE из вышеупомянутых бляшек или других биологических комплексов. Таким образом, гуманизированное антитело по настоящему изобретению будет с легкостью транспортироваться в кровотоки, другие биологические жидкости и в места, где образуются вышеупомянутые бляшки и/или другие биологические комплексы, или куда-либо еще, где Аβ N3pE проявляет повреждающие эффекты.

Кроме того, удаление Аβ N3pE из бляшек или других биологических комплексов с помощью гуманизированных антител по настоящему изобретению может привести к солюбилизации нерастворимых форм бляшек и таким образом привести к удалению полных бляшек из пораженной ткани, такой как ткань головного мозга. Это, в свою очередь, может привести к улучшению когнитивных функций у пациентов с диагнозом нейродегенеративного заболевания, такого как умеренное когнитивное расстройство (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD) или другие, нейродегенерация при синдроме Дауна, деменция с тельцами Леви, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию.

Связывание гуманизированных антител по настоящему изобретению с Аβ N3pE в кровотоке или других жидкостях организма может дополнительно привести к удалению циркулирующих или растворимых форм Аβ N3pE. Как обсуждалось выше, Аβ N3pE обладает высокой гидрофобностью и имеет высокое сродство к другим, например непироглутаматным, Аβ-пептидами, что приводит к образованию олигомерных и надмолекулярных структур, таких как амилоидные бляшки. Было показано, что, в частности, эти олигомерные структуры обладают высокой нейротоксичностью. Образование олигомерных структур приводит к повреждению клеток и гибели нейронных клеток. Таким образом, удаление циркулирующих или растворимых форм Аβ N3pE или даже олигомеров, содержащих Аβ N3pE, приводит к предупреждению повреждения клеток и/или нейротоксичности. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способы предупреждения нейродегенеративного заболевания, такого как умеренное когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD) или другие, нейродегенерация при синдроме Дауна, деменция с тельцами Леви, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию.

Кроме того, настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы предупреждения и/или лечения других заболеваний, которые обусловлены амилоидоподобными белками или ассоциированы с ними, в частности Аβ N3pE, таких как прогрессирующий надъядерный парез зра, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой

амиотрофический склероз), деменция, связанная с диабетом второго типа; возрастной кардиоамилоидоз и другие, включая макулярную дегенерацию.

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

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

Описание графических материалов

На фиг. 1 выделены границы CDR клона № 6 мышинового антитела.

Показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC). Три CDR из LC и HC помещены в рамку (выбрано Sircar et al., 2009 (Sircar A. et al.: RosettaAntibody: antibody variable region homology modeling server. *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, pp. W474-W479) в соответствии с Kabat and Wu, 1971 (Kabat E. A. and WU, T.T.: An Attempt to Locate the Non-helical and Permissively Helical Sequences of Proteins: Application to the Variable Regions of Immunoglobulin Light and Heavy Chains. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*; Vol. 68, No. 7, pp. 1501-1506, 1971) и Kabat et al., 1991 (Kabat E. A. and WU, T.T.: IDENTICAL V REGION AMINO ACID SEQUENCES AND SEGMENTS OF SEQUENCES IN ANTIBODIES OF DIFFERENT SPECIFICITIES: Relative Contributions of VH and VL Genes, Minigenes, and Complementarity-Determining Regions to Binding of Antibody-Combining Sites. *The Journal of Immunology*, Vol. 147; pp. 1709-1719, 1991); кроме CDR1 из HC, которая определена согласно Clothia et al., 1989 (Clothia C. et al.: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, Vol. 342, pp. 877-883, 1989).

На фиг. 2 показана очистка клона № 6 гуманизованного антитела с помощью хроматографии на белке G. Полученный рекомбинантным путем клон №6 гуманизованного антитела очищали с помощью хроматографии на белке G. 24 мкл фракции ввода (дорожка 1), фракции фильтрата (дорожка 22) и фракции элюирования (дорожка 3) загружали на 10% PAGE SDS при невозстанавливающих условиях. 2 мкг гуманизованного антитела (дорожка 4) сравнивали с мышинным антителом (дорожка 5) в окрашенном кумасси 10% SDS-геле.

На фиг. 3 показан расчет K_D для варианта HC T97 и варианта LC L41 клона №6 гуманизованного антитела. Аффинности связывания для варианта HC T97 и LC L41 клона №6 гуманизованного антитела с Аβ(pE3-18) измеряли с помощью SPR с использованием концентраций пептида 1-100 нМ (вариант HC T97) и 10-1000 нМ (вариант LC L41). K_D рассчитывали с 5,3 нМ. Значение K_D варианта LC L41 определяли с 162,7 нМ путем построения значений RU_{eq} относительно концентрации пептида и аппроксимации с использованием равновесной модели, как описано выше.

На фиг. 4 показано получение стабильной линии клеток, экспрессирующей вариант HC T97 клона № 6 гуманизованного антитела. А) Обработка с использованием MTX клеток CHO DG44, стабильно экспрессирующих вариант HC T97 клона № 6 гуманизованного антитела. 0,5 мкМ MTX (дорожка 2) приводит к увеличению экспрессии по сравнению с 0,1 мкМ MTX и без MTX (дорожки 1 и 4). Кроме того, меньшее количество клеток погибает по сравнению с обработкой 1 мкМ MTX (дорожка 4). 24 мкл надосадочной жидкости загружали на 10% PAGE SDS при невозстанавливающих условиях. В) 18 клонов получали после селекции клонов по методу предельных разведений и проанализировали с помощью вестерн-блоттинга. 24 мкл надосадочной жидкости загружали на 12% PAGE SDS при невозстанавливающих условиях. С) Пять из этих 18 клонов наращивали и культивировали в течение 7 дней так, что можно проанализировать уровни экспрессии в надосадочной жидкости с помощью SPR.

На фиг. 5 показано измерение с помощью ИТС клона № 6 гуманизованного антитела с пептидом АβpE3-18. Очищенный вариант HC T97 клона №6 гуманизованного антитела использовали для измерения с использованием ИТС. Верх: исходные данные измерения ИТС. Низ: сведение исходных данных с представлением концентрации добавленного пептида в виде зависимости от молярного соотношения пептид/антитело. Значения термодинамических параметров показаны слева.

На фиг. 6 показано связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73 (WT), или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с рецептором Fc-гамма CD16A.

На фиг. 7 показано связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73 (WT), или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с рецептором Fc-гамма CD32A.

На фиг. 8 показано связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73 (WT), или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с рецептором Fc-гамма CD32B.

На фиг. 9 показано связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73 (WT), или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с рецептором Fc-гамма CD64.

На фиг. 10 показан анализ связывания двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73 (WT), или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с C1q.

Подробное описание изобретения

Определения

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

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, обычно антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты: диатела; молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

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

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

"Гуманизированные" формы не являющиеся человеческими (например, мышинных) антител представляют собой иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Гуманизированные антитела преимущественно являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентное антитело), в которых остатки из участка, определяющего комплементарность (CDR), реципиента заменяют остатками из CDR отличных от человека видов (донорское антитело), таких как мышь, крыса или кролик, имеющих требуемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных участков.

Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения и оптимизации эффективности антител. В целом гуманизованное антитело будет содержать фактически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или фактически все участки CDR соответствуют участкам иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или фактически все участки FR представляют собой участки из последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально гуманизованное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature*. 332:323-329 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

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

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

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

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

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

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

<u>Аминокислота</u>	<u>Однобуквенный символ</u>	<u>Трехбуквенный символ</u>
Аланин	A	Ala
Аргинин	R	Arg

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

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

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

Термин "амилоидоз" относится к группе заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая без ограничения вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, такие заболевания, как включая без ограничения неврологические расстройства, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся потерей емкости когнитивной памяти, такие как, например, умеренное когнитивное нарушение (MCI), спорадическая болезнь Альцгеймера, деменция с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом (голландского типа); комплекс Гуам, представляющий собой паркинсонизм-деменцию, семейные формы болезни Альцгеймера, как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками или связаны с ними, такие как прогрессирующий надъядерный паралич зрения, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, деменция, связанная с ВИЧ, ALS (боковой амиотрофический склероз), миозит с включениями (IBM), диабет типа 2 и возрастной кардиоамилоидоз, и различные заболевания глаз, включая макулярную дегенерацию, связанную с друзами нейропатии зрительного нерва и катаракту вследствие отложения бета-амилоида.

"Амилоид β , A β или β -амилоид" является признанным в данной области термином и относится к

белкам и пептидам β -амилоида, белку-предшественнику β -амилоида (APP), а также к их модификациям, фрагментам и любым функциональным эквивалентам. В частности, под используемым в данном документе β -амилоидом подразумевают любой фрагмент, продуцируемый при протеолитическом расщеплении APP, но особенно те фрагменты, которые вовлечены в амилоидную патологию или ассоциированы с ней, включая без ограничения $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$. Аминокислотные последовательности этих $A\beta$ -пептидов следующие:

$A\beta$ 1-42 (SEQ ID NO: 1):

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

$A\beta$ 1-40 (SEQ ID NO: 2):

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

$A\beta$ 1-38 (SEQ ID NO: 3):

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

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

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

$A\beta$ 3-42 (SEQ ID NO: 4):

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

$A\beta$ 3-40 (SEQ ID NO: 5):

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

$A\beta$ 3-38 (SEQ ID NO: 6):

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

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, специфичным для $A\beta$ -пептидов человека, которые усечены с N-конца путем отщепления или удаления аминокислот № 1 и 2 с N-конца и в которых таким образом незащищенная N-концевая аминокислота № 3 модифицируется с образованием пироглутамата, и которые вследствие этого несут остаток пироглутамата в положении 3 с N-конца (далее называемых $A\beta$ -пептидами N3pE, или N3pE- $A\beta$ -пептидами, или пироглутаматными $A\beta$ -пептидами).

В первом аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором варибельная часть легкой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCKSSQSLX₁SDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLX
₂YLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCYVQGTTHFPFTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 7),

где

X₁ выбран из Y и H и

X₂ выбран из A, I и T.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L : KSSQSLLX₁SDGKTYLN (SEQ ID NO: 8),

где X₁ выбран из Y и H

CDR2 V_L : LVSKLDS (SEQ ID NO: 9) и

CDR3 V_L : VQGTHFP (SEQ ID NO: 10).

Более предпочтительно в переменной части легкой цепи антитела по настоящему изобретению X₁ представляет собой Y и X₂ представляет собой I, при этом переменная часть легкой цепи таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIY

LVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGGT

KVEIK (SEQ ID NO: 11).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L : KSSQSLLYSDGKTYLN (SEQ ID NO: 12),

CDR2 V_L : LVSKLDS (SEQ ID NO: 9) и

CDR3 V_L : VQGTHFP (SEQ ID NO: 10).

Более предпочтительно в переменной части легкой цепи антитела по настоящему изобретению X₁ представляет собой Y и X₂ представляет собой A, при этом переменная часть легкой цепи таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLA

YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGG

TKVEIK (SEQ ID NO: 13).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10.

Наиболее предпочтительно в переменной части легкой цепи антитела по настоящему изобретению X₁ представляет собой Y и X₂ представляет собой T, при этом переменная часть легкой цепи таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLT

YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGG

TKVEIK (SEQ ID NO: 14).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10.

Еще более предпочтительно в переменной части легкой цепи антитела по настоящему изобретению X₁ представляет собой H и X₂ представляет собой T, при этом легкая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLT

YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGGG

TKVEIK (SEQ ID NO: 15).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 15, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L: KSSQSLHSDGKTYLN (SEQ ID NO: 16),

CDR2 V_L: LVSKLDS (SEQ ID NO: 9) и

CDR3 V_L: VQGTHFP (SEQ ID NO: 10).

Дополнительно в соответствии с первым аспектом настоящего изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором переменная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCASGYSFTGX₃TMNWVRQAPGQGLEWMG
LINPX₄NX₅VTRYNQKFX₆GRVTX₇X₈RDTSTTTVX₉MELTSLTSEDTAX₁₀YYCT
REAKREWDETYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 17);

где

X₃ выбран из Y и H;

X₄ выбран из Y и S;

X₅ выбран из G, T, A и E;

X₆ выбран из K и Q;

X₇ выбран из L и I;

X₈ выбран из I и T;

X₉ выбран из Y и H и

X₁₀ выбран из V и T.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 17, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGX₃TMN (SEQ ID NO: 18),

где X₃ выбран из Y и H

CDR2 V_H: LINPX₄NX₅VTRYNQKFX₆G (SEQ ID NO: 19);

где X₄ выбран из Y и S,

X₅ выбран из G, T, A и E;

X₆ выбран из K и Q и

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Предпочтительно в переменной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой Y, X₄ представляет собой Y, X₅ представляет собой G, X₆ представляет собой K, X₇ представляет собой T, X₈ представляет собой I, X₉ представляет собой Y и X₁₀ представляет собой V, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGL
INPYNGVTRYNQKFKGRVTLIRDSTTTVYMELTSLTSEDTAVYYCTREAKRE
WDETYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 21).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 21, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGYTMN (SEQ ID NO: 22),

CDR2 V_H: LINPYNGVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 23);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Более предпочтительно в переменной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой H, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой G, X₆ представляет собой Q, X₇ представляет собой I, X₈ представляет собой T, X₉ представляет собой H и X₁₀ представляет собой V, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGL
INPSNGVTRYNQKFKGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDTAVYYCTREAKRE
WDETYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 24).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вари-

белую часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 24, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNGVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 26);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Еще более предпочтительно в вариабельной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой H, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой G, X₆ представляет собой Q, X₇ представляет собой I, X₈ представляет собой T, X₉ представляет собой H, и X₁₀ представляет собой T, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGL
INPSNGVTRYNQKFQGRVTITRDSTTTVHMELTSLTSEDATYYCTREAKRE
WDETYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 27).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вариабельную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNGVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 26);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Наиболее предпочтительно в вариабельной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой H, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой T, X₆ представляет собой Q, X₇ представляет собой I, X₈ представляет собой T, X₉ представляет собой H и X₁₀ представляет собой T, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGL
INPSNTVTRYNQKFQGRVTITRDSTTTVHMELTSLTSEDATYYCTREAKRE
WDETYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 66).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вариабельную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 66, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNTVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 67);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Еще более предпочтительно в вариабельной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой H, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой A, X₆ представляет собой Q, X₇ представляет собой I, X₈ представляет собой T, X₉ представляет собой H и X₁₀ представляет собой T, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGL
INPSNAVTRYNQKFQGRVTITRDSTTTVHMELTSLTSEDATYYCTREAKRE
WDETYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее вариабельную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 68, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNAVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 69);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Еще более предпочтительно в варибельной части тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению X₃ представляет собой H, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой E, X₆ представляет собой Q, X₇ представляет собой I, X₈ представляет собой T, X₉ представляет собой H и X₁₀ представляет собой T, при этом тяжелая цепь таким образом содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYSFTGHTMNWVRQAPGQGLEWMGL

INPSNEVTRYNQKFQGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDATYYCTREAKRE

WDETYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 70).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее варибельную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNEVTRYNQKFQG (SEQ ID NO: 71);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20).

Кроме того, согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительными являются гуманизированные антитела, содержащие, состоящие фактически из или состоящие из следующих комбинаций варибельных частей легкой цепи и тяжелой цепи:

Вариант гуманизированного антитела	Варибельная часть легкой цепи, SEQ ID NO:	Варибельная часть тяжелой цепи, SEQ ID NO:
Основной	7	17
i)	11	21
ii)	11	24
iii)	11	27
iv)	11	66
v)	11	68
vi)	11	70
vii)	13	21
viii)	13	24
ix)	13	27
x)	13	66
xi)	13	68
xii)	13	70
xiii)	14	21
xiv)	14	24
xv)	14	27
xvi)	14	66
xvii)	14	68
xviii)	14	70
xix)	15	21
xx)	15	24
xxi)	15	27
xxii)	15	66
xxiii)	15	68
xiv)	15	70

Более предпочтительно варибельная часть легкой цепи гуманизированного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

Еще более предпочтительно варибельная часть тяжелой цепи гуманизированного антитела в соот-

ветствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

Еще более предпочтительно переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 66, 72 и 74.

Наиболее предпочтительно переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70.

Наиболее предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27.

Еще более предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27, и переменная часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10, и переменная часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: SEQ ID NO: 27, содержит участки CDR CDR1 V_H под SEQ ID NO: 25, CDR2 V_H под SEQ ID NO: 26 и CDR3 V_H под SEQ ID NO: 20.

Еще более предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70.

Еще более предпочтительны переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, и переменная часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10, и переменная часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, содержит участки CDR CDR1 V_H под SEQ ID NO: 25, CDR2 V_H под SEQ ID NO: 71 и CDR3 V_H под SEQ ID NO: 20.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором переменная часть легкой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DIQMTQSPSSLSASVIGDRVTITCRSSQSLVHSDGNTYLHWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPPTFGQGT
KVEIK (SEQ ID NO: 28).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 28, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L: RSSQSLVHSDGNTYLH (SEQ ID NO: 29),
CDR2 V_L: KVSNRFS (SEQ ID NO: 30) и
CDR3 V_L: SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 31).

Дополнительно в соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором переменная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGLEWVSFIS
NLAYSIYYADTGTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYDNI
LDYVMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 32).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 32, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GFTFSDYGMA (SEQ ID NO: 33),

CDR2 V_H: FISNLAYSIYYADTVTG (SEQ ID NO: 34),

CDR3 V_H: YDYDNILDYVMDY (SEQ ID NO: 35).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, где переменная часть легкой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLWNWFQQRPGQSPRRLIY

VVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHTFPFTFGGGT

KVEIK (SEQ ID NO: 36).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, содержит следующие участки CDR в легкой цепи:

CDR1 V_L: KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 37),

CDR2 V_L: VVSKLDS (SEQ ID NO: 38) и

CDR3 V_L: VQGTHTFPFT (SEQ ID NO: 39).

Дополнительно в соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором переменная часть тяжелой цепи указанного антитела содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKKASGYIFNNYWINWVRQAPGQGLEWMGQI

YPGDGDNTYNGKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGYIV

YWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 40).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, имеющее переменную часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40, содержит следующие участки CDR в тяжелой цепи:

CDR1 V_H: GYIFNNY (SEQ ID NO: 41),

CDR2 V_H: QIYPGDGDNTYNGKFKG (SEQ ID NO: 42),

CDR3 V_H: EGYIVY (SEQ ID NO: 43).

В дополнительном особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения относится к гуманизованным антителам, специфичным для N3pE-Aβ-пептидов человека, которые содержат участки CDR в легкой цепи, выбранные из:

CDR 1 V _L	CDR 2 V _L	CDR 3 V _L
KSSQSLHSDGKTYLN (SEQ ID NO: 16)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 9)	VQGTHTFP (SEQ ID NO: 10)
RSSQSLVHSDGNTYLH (SEQ ID NO: 29)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 30)	SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 31)
KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 37)	VVSKLDS (SEQ ID NO: 38)	VQGTHTFPFT (SEQ ID NO: 39)

Кроме того, настоящее изобретение относится к человеческим антителам, специфичным для N3pE-Aβ-пептидов человека, которые содержат участки CDR в тяжелой цепи, выбранные из:

CDR 1 V _H	CDR 2 V _H	CDR 3 V _H
GYSFTGYTMN (SEQ ID NO: 22)	LINPYNGVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 23)	EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20)
GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25)	LINPSNGVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 26)	YDYDNILDYVMDY (SEQ ID NO: 35)
GFTFSDYGMA (SEQ ID NO: 33)	FISNLAYSIIYYADTVTG (SEQ ID NO: 34)	EGYIVY (SEQ ID NO: 43)
GYIFNNY (SEQ ID NO: 41)	QIYPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 42)	
	LINPSNTVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 67)	
	LINPSNAVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 69)	
	LINPSNEVTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 71)	

Предпочтительными гуманизованными антителами в соответствии с настоящим изобретением являются гуманизованные формы моноклональных мышинных антител, которые продуцируются линией клеток гибридомы, выбранной из:

- Аβ 5-5-6 (№ депонирования DSM ACC 2923),
 - Аβ 6-1-6 (№ депонирования DSM ACC 2924),
 - Аβ 17-4-3 (№ депонирования DSM ACC 2925),
 - Аβ 24-2-3 (№ депонирования DSM ACC 2926),
- которые описаны в WO 2010/009987.

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

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие гуманизованные антитела по настоящему изобретению, содержащие CDR тяжелой и легкой цепей, как изложено в данном документе.

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

Предпочтительные полинуклеотиды по настоящему изобретению кодируют антитела, содержащие CDR, выбранные из таких, которые состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 9, 10, 16, 29-31 и 37-39 в легкой цепи, и выбранные из таких, которые состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 20, 22, 23, 25, 26, 33-35, 41-43, 67, 69 и 71 в тяжелой цепи.

Кроме того, предпочтительными являются полинуклеотиды, которые кодируют антитела, где варибельная часть легкой цепи содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 7, 11, 13, 14 и 28.

Одинаково предпочтительными являются полинуклеотиды, которые кодируют антитела, в которых варибельная часть тяжелой цепи содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17, 21, 24, 27, 32, 36, 40, 66, 68 и 70.

В дополнительном варианте осуществления гуманизованные антитела по настоящему изобретению имеют Fc-участок IgG1 человека, который содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3.

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

Эффекторные функции гуманизованных антител по настоящему изобретению также могут быть опосредованы взаимодействием Fc-участка антитела с Fc-рецепторами (FcR), которые являются специализированными рецепторами клеточной поверхности на гемопоэтических клетках. Fc-рецепторы относятся к надсемейству иммуноглобулинов и, как было показано, опосредуют как удаление патогенов, покрытых антителами, путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных

других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) (Van de Winkel and Anderson, J. Leuk. Bioi. 49:511-24; 1991).

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

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления в гуманизированных антителах по настоящему изобретению имеется Fc-участок IgG человека, который содержит одну или более аминокислотных замен, предпочтительно замену 3 или 2 аминокислот, наиболее предпочтительно замену одной аминокислоты. Аминокислотные замены можно осуществить с помощью обычных способов, таких как сайт-направленный мутагенез Fc-участка IgG1 человека антител по настоящему изобретению.

В более предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по настоящему изобретению имеют Fc-участок IgG человека, который содержит аминокислотную замену в положении 322. Аминокислотная замена предпочтительно представляет собой K322A.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по настоящему изобретению имеют Fc-участок IgG человека, который содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 74.

Дополнительно наиболее предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности g1l SEQ ID NO: 27, и Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 74.

Еще более предпочтительны переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27, и Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 74; переменная часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10, и переменная часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27, содержит участки CDR CDR1 V_H под SEQ ID NO: 25, CDR2 V_H под SEQ ID NO: 26 и CDR3 V_H под SEQ ID NO: 20.

Еще более предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, и Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 74.

Еще более предпочтительно переменная часть легкой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, и переменная часть тяжелой цепи гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, и Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 74; переменная часть легкой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14, содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10, и переменная часть тяжелой цепи указанного антитела, которая содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 70, содержит участки CDR CDR1 V_H под SEQ ID NO: 25, CDR2 V_H под SEQ ID NO: 71 и CDR3 V_H под SEQ ID NO: 20.

Предпочтительные полинуклеотиды по настоящему изобретению кодируют антитела, содержащие CDR, выбранные из таких, которые состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 9, 10, 16, 29-31 и 37-39 в легкой цепи, и выбранные из таких, которые состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 20, 22, 23, 25, 26, 33-35, 41-43, 67, 69 и 71 в тяжелой цепи, и содержащие Fc-участок IgG человека, выбранный из SEQ ID NO: 73 и 74.

Кроме того, предпочтительными являются полинуклеотиды, которые кодируют антитела, в которых

вариабельная часть легкой цепи содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 7, 11, 13, 14 и 28; и где Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 73 или 74.

Одинаково предпочтительными являются полинуклеотиды, которые кодируют антитела, в которых вариабельная часть тяжелой цепи содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17, 21, 24, 27, 32, 36, 40, 66, 68 и 70; и где Fc-участок IgG человека содержит, состоит фактически из или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 73 или 74.

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

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

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

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

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

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

фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. Последовательности ДНК, полученные из сайтов сплайсинга и полиаденилирования SV40, можно использовать для обеспечения требуемых нетранскрибируемых генетических элементов.

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

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

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

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

pEFRHDSGYEVHMQKLV (SEQ ID NO: 50),

pEFRHDSGYEVHMQKL (SEQ ID NO: 54),

pEFRHDSGYEVHMQK (SEQ ID NO: 55),

pEFRHDSGYEVHMQ (SEQ ID NO: 56),

pEFRHDSGYEVHH (SEQ ID NO: 57),

pEFRHDSGYEVH (SEQ ID NO: 58),

pEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 59),

pEFRHDSGYE (SEQ ID NO: 60),

pEFRHDSGY (SEQ ID NO: 61),

pEFRHDSG (SEQ ID NO: 62),

pEFRHDS (SEQ ID NO: 63),

pEFRHD (SEQ ID NO: 72)

pEFRH (SEQ ID NO: 64) и

pEFR (SEQ ID NO: 65).

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

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

Гуманизированные антитела по настоящему изобретению не связываются с последовательностями или частями последовательностей, которые не содержат пироглутамат на N-конце.

Кроме того, гуманизированное антитело по настоящему изобретению может также связываться с вариантом A β N3pE.

В контексте настоящего изобретения вариант A β N3pE представляет собой, в частности,

pE-A β ₃₋₃₈,

pE-A β ₃₋₄₀,

pE-A β ₃₋₄₂.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение также предусматривает применение гуманизованного антитела по настоящему изобретению в получении лекарственного препарата для лечения, предупреждения или регрессии умеренного когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадической болезни Альцгеймера (SAD) или семейных форм деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейной британской деменции (FBD) и семейной датской деменции (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезни Альцгеймера, или для регрессии снижения когнитивных способностей, улучшения когнитивных функций, для лечения снижения когнитивных способностей и предупреждения снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом умеренное когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна и клиническая или доклиническая церебральная амилоидная ангиопатия, предпочтительно болезнь Альцгеймера.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает гуманизованные антитела, раскрытые в данном документе, для применения в предупреждении, лечении или регрессии умеренного когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадической болезни Альцгеймера (SAD) или семейных форм деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейной британской деменции (FBD) и семейной датской деменции (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна и клинической или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии, предпочтительно болезни Альцгеймера; в лечении, предупреждении или регрессии снижения когнитивных способностей, улучшения когнитивных функций, лечении снижения когнитивных способностей и предупреждения снижения когнитивных способностей у субъекта с диагнозом умеренное когнитивное нарушение (MCI), болезнь Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD), или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерация при синдроме Дауна и клиническая или доклиническая церебральная амилоидная ангиопатия, предпочтительно болезнь Альцгеймера; или ингибирования образования амилоидных бляшек или эффектов, обусловленных Аβ N3pE, у млекопитающих, предпочтительно у человека.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ сохранения или увеличения емкости когнитивной памяти, но в особенности восстановления емкости когнитивной памяти у млекопитающего, в частности у человека, страдающего от нарушения памяти, путем введения животному, в частности млекопитающему или человеку, гуманизованного антитела или фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело в соответствии с настоящим изобретением и описываемое в данном документе выше.

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

- a) введение гуманизованного антитела по настоящему изобретению или его фрагмента субъекту и
- b) измерение концентрации Аβ N3pE в биологическом образце, взятом у субъекта.

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

- a) введение первого количества антитела или его фрагмента субъекту;
- b) измерение концентрации Аβ N3pE в биологическом образце, взятом у субъекта в течение от 3 ч до двух недель после введения первой дозы;
- c) при необходимости расчет второго количества антитела или его фрагмента, исходя из результата, полученного на стадии b), причем второе количество является таким же или отличается от первого количества, и

d) введение второго количества антитела или его фрагмента.

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

a) получение первого биологического образца от субъекта;

b) измерение исходной концентрации Аβ N3pE в первом образце;

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

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

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

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

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

Эффективность гуманизованных антител по настоящему изобретению в диагностике, предупреждении и/или лечении амилоидоза, как, например, умеренного когнитивного нарушения, болезни Альцгеймера, семейной британской деменции или семейной датской деменции и, к примеру, нейродегенерации при синдроме Дауна, можно тестировать на существующих моделях болезни Альцгеймера у животных.

Подходящие модели болезни Альцгеймера у животных рассматриваются в McGowan et al., *TRENDS in Genetics*, Vol. 22, No. May 2006, pp 281-289, и выбраны из

PDAPP, Tg2576, APP23, TgCRND8, PSEN_{1M146V} или PSEN_{1M146L},

PSAPP, APP_{Dutch}, BRI-Aβ40 и BRI-Aβ42, JNPL3, Tau_{p301S}, Tau_{V337M}, Tau_{R406W},

rTg4510, H_{Tau}, TAPP, 3 x TgAD,

описываемых ниже.

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

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

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

TgCRND8: мыши экспрессируют несколько мутаций APP (шведская плюс Indiana). Когнитивное расстройство совпадает с быстрым развитием внеклеточных бляшек в возрасте ~ 3 месяцев. Когнитивное расстройство можно обратить с помощью вакцинотерапии против Аβ.

PSEN_{1M146V} или PSEN_{1M146L} (линии 6.2 и 8.9 соответственно): эти модели были первой демонстрацией *in vivo* того, что мутантный PSEN1 избирательно повышает Аβ42. Не наблюдается выраженного бляшкообразования.

PSAPP (Tg2576 x PSEN_{1M146L}, PSEN1-A246E + APP_{SWE}): дигенные трансгенные мыши с добавлением мутантного трансгена PSEN1, который значительно ускоряет амилоидную патологию по сравнению с однократно трансгенными мышами с мутантным APP, демонстрируя, что повышение уровня Аβ42 под влиянием PSEN1 усиливает бляшкообразование.

APP_{Dutch}: мыши экспрессируют APP с голландской мутацией, которая вызывает наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом голландского типа у людей. У мышей с APP_{Dutch} развивается тяжелая конгофильная амилоидная ангиопатия. Добавление мутантного трансгена PSEN1 перераспределяет амилоидную патологию на паренхиму, указывая на разные роли Аβ40 и Аβ42 в сосудистой и паренхиматозной амилоидной патологии.

BRI-Аβ40 и BRI-Аβ42: мыши экспрессируют отдельные Аβ-изоформы без сверхэкспрессии APP. Только у мышей, экспрессирующих Аβ42, развиваются сенильные бляшки и САА, тогда как у мышей BRI-Аβ40 бляшки не развиваются, указывая на то, что Аβ42 имеет значение для образования бляшек.

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

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

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

Tau_{R406W}: мыши, экспрессирующие 4R MAPT человека с мутацией R406W под контролем промотора САМКII. У мышей развиваются включения MAPT в переднем мозге с возраста 18 месяцев и имеет место нарушение ассоциативной памяти.

rTg4510: индуцируемые с использованием системы TET-off MAPT-трансгенные мыши. Аномальная патология MAPT возникает с возраста одного месяца. Мыши характеризуются прогрессирующей патологией NFT и тяжелой потерей клеток. Когнитивное расстройство выражено с 2,5-месячного возраста. Отключение трансгена улучшает когнитивные характеристики, но патология NT ухудшается.

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

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

3xTgAD: тройная трансгенная модель, экспрессирующая мутантный APP_{swe}, MAPT_{P301L} на фоне 'нокин' PSEN1_{M146V} (PSNE1-KI). У мышей развиваются бляшки с 6 месяцев и патология MAPT с момента достижения 12-месячного возраста, подкрепляя гипотезу о том, что APP или Аβ могут непосредственно влиять на нейрофибриллярную патологию.

Кроме того, в WO 2009/034158 раскрываются модели на трансгенных животных, не являющихся человеком, в которых трансген кодирует по меньшей мере один бета-амилоидный (Аβ) пептид, выбранный из группы, состоящей из АβN3E-42, АβN3Q-42, АβN3E-40 и АβN3Q-40. Эти Аβ-пептиды представляют собой субстраты QC и QPCTL, что приводит к циклизации N-концевого глутамин (Q) или глутамата (N) в пироглутамат (pGlu). Таким образом, эти модели на трансгенных животных представляют собой модельную систему для исследования влияния pGlu-Аβ-пептидов на ход развития нейродегенерации.

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

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

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

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

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

Примеры комбинаций фермент-субстрат включают, например:

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

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

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

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

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

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

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

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

Для иммуногистохимического анализа образец ткани может быть свежим или замороженным, или может быть залит в парафин и фиксирован, например консервантом, таким как формалин.

Настоящее изобретение также относится к композиции, которая содержит определенные выше гуманизированные антитела, где указанная композиция представляет собой композицию для применения в

диагностике, в частности в диагностике нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из умеренного когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера; в частности, путем выявления Аβ N3pE или его вариантов в биологическом образце.

Диагностические наборы

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

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

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

Настоящее изобретение также относится к гуманизованному антителу по настоящему изобретению или к композиции, содержащей гуманизованное антитело, которые определены выше, для применения в способе диагностики *in vitro*. В частности, данный способ диагностики направлен на проведение диагностики нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из умеренного когнитивного нарушения (MCI), болезни Альцгеймера (AD), как, например, спорадическая болезнь Альцгеймера (SAD) или семейные формы деменции Альцгеймера (FAD), как, например, семейная британская деменция (FBD) и семейная датская деменция (FDD), нейродегенерации при синдроме Дауна; предпочтительно болезни Альцгеймера; в частности путем выявления Аβ N3pE или его вариантов в биологическом образце.

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

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

приведение в контакт гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением с образцом, предпочтительно выбранным из образца, представляющего собой сыворотку крови, ликвор или CSF, наиболее предпочтительно с образцом сыворотки крови; или с определенной частью тела или областью тела субъекта с подозрением поражения указанным состоянием или заболеванием, и выявление связывания антитела с Аβ N3pE из образца.

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

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

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

(c) выявление образования иммунологического комплекса и

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

Также включен способ определения степени нагрузки амилоидогенными бляшками тканей и/или

жидкостей организма, предусматривающий:

- (a) получение репрезентативного образца исследуемой ткани и/или жидкости организма;
- (b) тестирование указанной образцы на присутствие амилоидного белка с помощью гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением или химерного антитела или его фрагмента;
- (c) определение количества гуманизованного антитела, связанного с белком; и
- (d) расчет нагрузки бляшками ткани и/или жидкостей организма.

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

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

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

Дополнительно включена в настоящее изобретение смесь, содержащая гуманизованное антитело по настоящему изобретению или химерное антитело или его фрагмент, описанные в данном документе ранее, включающая любое функционально эквивалентное антитело или любое его производное или функциональные части в терапевтически эффективном количестве, и необязательно дополнительное биологически активное вещество, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения другое биологически активное вещество или соединение также может представлять собой терапевтическое средство, которое можно использовать для лечения амилоидоза, вызванного Аβ N3pE, или можно использовать в лечении других неврологических нарушений.

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

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

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

Настоящее изобретение дополнительно относится к смеси, в которой соединение представляет со-

бой ингибитор холинэстеразы (ChE), в частности к смеси, в которой соединение представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из такрина, ривастигмина, донепезила, галантамина, ниацина и мемантина.

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

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

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

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

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

Другие соединения, которые могут быть соответствующим образом использованы в смесях в комбинации с гуманизированным антителом в соответствии с настоящим изобретением, описаны в WO 2008/065141 (см. особенно страницы 37/38), включая ингибиторы PEP (pp. 43/44), LiCl, ингибиторы дипептидиламинопептидаз, предпочтительно ингибиторы DP IV-или DP IV-подобных ферментов (см. стр. 48/49); ингибиторы ацетилхолинэстеразы (ACE) (см. стр. 47), усилители PIMT, ингибиторы бета-секретаз (см. стр. 41), ингибиторы гамма-секретаз (см. стр. 41/42), ингибиторы нейтральной эндопептидазы, ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (PDE-4) (см. стр. 42/43), ингибиторы TNFalpha, антагонисты мускариновых M1-рецепторов (см. стр. 46), антагонисты NMDA-рецепторов (см. стр. 47/48), ингибиторы сигма-1-рецепторов, антагонисты гистаминовых H3-рецепторов (см. стр. 43), иммуномодулирующие средства, иммуносупрессивные средства или средство, выбранное из группы, состоящей из антегрена (натализумаба), неурелана (фампридин-SR), кампата (алемтузумаба), IR 208, NBI 5788/MSP 771 (типимотида), паклитаксела, Anergix.MS (AG 284), SH636, дифферина (CD 271, адапалена), BAY 361677 (интерлейкина-4), ингибиторов матриксной металлопротеиназы (например, BB 76163), интерферона- γ (трофобластина) и SAIK-MS; антитело к бета-амилоиду (см. стр. 44), ингибиторы цистеиновой протеазы (см. стр. 44); антагонисты MCP-1 (см. стр. 44/45), ингибиторы отложения амилоидного белка (см. 42) и ингибиторы синтеза бета-амилоида (см. стр. 42), документ о которых включен в данный документ посредством ссылки.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или более вспомогательных средств, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы, диспергирующие средства, консерванты или буферы, которые могут уве-

личить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Гуманизированные антитела по настоящему изобретению можно получить с носителями, которые будут защищать гуманизированное антитело от быстрого высвобождения, например состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, простые полиортоэфиры и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы получения таких составов обычно известны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

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

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

Стерильные инъекционные растворы можно получить путем включения гуманизированного антитела в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, указанных выше, при необходимости с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения гуманизированного антитела в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой необходимый дополнительный ингредиент из ранее стерильно профильтрованного раствора.

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

Эффективные дозы и схемы приема для гуманизированных антител по настоящему изобретению

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

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

Примеры

1. Подход с использованием гуманизации для создания N3pE-Аβ-специфичных гуманизованных антител

Клоны №6, №17 и №24 N3pE-Аβ-специфичных мышинных моноклональных антител получали из линий клеток гибридомы 6-1-6, 17-4-3, и 24-2-3, которые были депонированы в соответствии с Будапештским договором и доступны в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) в Брауншвейге, Германии, с датой депонирования 17 июня 2008 г. и с соответствующими номерами депонирования (клон 6-1-6): DSMACC2924, (клон 17-4-3): DSM ACC2925, (клон 24-2-3): DSM ACC2926.

Первой стадией процесса гуманизации клонов № 6, № 17 и № 24 антител было определение CDR в переменных доменах легкой и тяжелой цепей. CDR предсказывали на сервере моделирования антител Rosetta (<http://antibody.graylab.jhu.edu>). На фиг. 1 показаны иллюстративные CDR, предсказанные для клона № 6.

Чтобы выбрать подходящий каркас для CDR-прививки, необходимо идентифицировать человеческие последовательности с наивысшим сродством к антителу, не являющемуся человеческим. С помощью анализа Blast переменный домен легкой цепи (Lv) и тяжелой цепи (Hv) отдельно сравнивали с пулом опубликованных человеческих последовательностей. Для легкой цепи обнаружили последовательность человеческого антитела с 82% идентичностью, которая относится к классу LC каппа. Наивысшую гомологию для тяжелой цепи имеет аминокислотная последовательность человека с 62% идентичностью.

Чтобы сгруппировать выбранную каркасную последовательность человеческого антитела с последовательностями генов зародышевой линии, проводили поиск Blast в библиотеке зародышевых линий IMGT. Для легкой цепи клона № 6 и клона № 24 обнаружили последовательность с кодом последовательности IGKV2-30*01. Переменный участок легкой цепи клона № 17 был наиболее близок к IGKV2-30*02. Коды переменного участка тяжелой цепи, идентифицируемые как IGHV1-3*01, IGHV1-69*13 и IGHV3-48*01, соответствуют клону № 6, клону № 17 и клону № 24 соответственно. В табл. 1 показаны параметры каркаса переменных участков гуманизованных антител.

Таблица 1. Параметры каркаса для переменных участков гуманизованных антител

Клон №	Lv			Hv		
	Aa	№ доступа	Семейство	Aa	№ доступа	Семейство
6	VAC01730.1	AB064102.1	IGKV2-30*01	AAS85817.1	AY392875.1	IGHV1-3*01
24	VAC01730.1	AB064102.1	IGKV2-30*01	AAD30405.1	AF115119.1	IGHV1-69*13
17	VAC01734.1	AB064106.1	IGKV2-30*02	AAS858165	AY392925.1	IGHV3-48*01

aa = аминокислотная последовательность,

№ доступа = номер доступа,

семейство = семейство генов

С помощью CDR-прививания CDR из клонов № 6, № 17 и № 24 мышинного антитела комбинировали с соответствующим каркасом человеческого антитела для создания гуманизованного антитела. Константный участок тяжелой цепи человеческого IgG1 использовали для восстановления полных анти-

тел. Вариабельные домены легкой цепи гибридизировали с константным участком человеческой каппа-цепи.

2. Выделение РНК и синтез кДНК

В качестве источника для константных последовательностей выделяли РНК человеческих В-клеток путем лизиса 500 мкл цельной крови с 5 мл 1× раствора для лизиса FACS (Becton Dickinson) в течение 10 мин при комнатной температуре. Лизат центрифугировали при 300 g в течение 5 мин; осадок промывали два раза с использованием PBS, а затем растворяли в 350 мкл буфера RA1 Nucleo Spin® RNA II (Macherey-Nagel) и добавляли 3,5 мкл 0,5 М ТСЕР (SIGMA). РНК выделяли согласно инструкциям изготовителей. Сначала 10 мкл РНК инкубировали с 1 мкл 0,5 мкг/мкл праймера OligodT (Invitrogen) и 1 мкл 10 мМ dNTP в течение 5 мин при 65°C. Затем 4 мкл 5× буфера для синтеза первой нити (Invitrogen), 2 мкл 100 мМ DTT и 0,5 мкл обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen) добавляли к 20 мкл и смесь инкубировали в течение 5 мин при 25°C, 50 мин при 50°C и 15 мин при 70°C. С помощью ПЦР с парами праймеров, показанными в табл. 2, можно амплифицировать синтезированную кДНК константного участка легкой и тяжелой цепи.

Таблица 2. Праймер для клонирования константного участка

SEQ ID NO	Название	Последовательность
44	hкappa5'	ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
45	hкappa3'	CTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC
46	hlgG1Hc5'1	AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
47	hlgG1Hc3'	TCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG

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

RT_chim_humK16f: CAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTG (SEQ ID NO: 48);

RT_chim_humK16r: GTACCTGCACGCAGTAATAAAC (SEQ ID NO: 49).

Для амплификации эталонного мышинового гена использовали праймер HPRT.

Для проведения амплификации 7,5 мкл Sybergreen (Firma), 1 мкл прямого праймера (25 пмоль/мкл), 1 мкл обратного праймера (25 пмоль/мкл), 5,5 мкл бидистиллированной H₂O и 1 мкл кДНК использовали в термоциклере.

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

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

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

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

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

4. Очистка рекомбинантного антитела с помощью хроматографии на белке G

Клон № 6 гуманизированного антитела очищали для исследования антигенсвязывающего свойства белка по сравнению с исходным мышинным антителом. Соответственно, получали 300 мл надосадочной жидкости с экспрессированным химерным и гуманизированным антителом и очищали с помощью хроматографии на белке G (фиг. 2). Поскольку количество экспрессированного антитела было очень низким,

выход составлял менее 0,1 мкг/мл, а в общей сложности 25 мкг очищенного белка. Элюированное антитело концентрировали до приблизительно 200 мкг/мл и 2 мкг белка наносили на SDS-PAGE с последующим окрашиванием с использованием кумасси (фиг. 2).

5. Измерение поверхностного плазмонного резонанса для сравнения связывания антигена мышинным и гуманизированным антителом

Измерение поверхностного плазмонного резонанса использовали для исследования эффективности связывания гуманизированного антитела с АβрЕЗ-18 (фиг. 3). Для предупреждения возникновения эффектов массопереноса и avidности в ходе измерения использовали следующую процедуру.

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

Измерение кинетики проводили при различных концентрациях (от 5 до 1000 нМ) пептида АβрЕЗ-18. Графики измеренных рядов концентраций показаны в виде графика наложения с использованием сенсограмм, скорректированных по сенсограмме, измеряющей подвижный буфер, выровненных в момент введения и с поправкой на исходные данные до нуля перед введением. Результаты оценивают согласно простой модели взаимодействия 1:1 (аппроксимация с использованием уравнения Ленгмюра), которая преобразовывает константы скорости k_{off} и k_{on} . На фиг. 3 показаны кривые SPR-связывания, состоящие из кривой ассоциации и диссоциации.

Кажущиеся кинетические константы в соответствии с аппроксимацией с использованием уравнения Ленгмюра 1:1 приведены в табл. 3. Из-за того, что гуманизированное антитело связано с поверхностью чипа нековалентно, небольшие количества молекул антитела вымывались при измерении. Поэтому значения R_{max} аппроксимировали локально для каждой отдельной сенсограммы.

Таблица 3. Статистические данные аппроксимации с использованием уравнения Ленгмюра кинетических параметров клона № 6 гуманизированного антитела

АβрЕЗ-18 в нМ	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	R_{max} (отн. ед.)	RI (отн. ед.)	KA (1/М)	KD (М)	Req (отн. ед.)	Chi2
	8,09E+05	0,0222		0,303	3,65E+07	2,74E-08		0,803
0			1,19				0	1. измерение
5			18,1				2,79	
10			15,5				4,15	
20			16,7				7,05	
50			16,9				10,9	
100			18,7				14,7	
200			20,2				17,7	
500			21,7				20,5	
1000			22,7				22,1	
0			0				0	
5			11,4				1,76	
10			15,5				4,14	
20			17,5				7,39	
50			16,9				10,9	
100			18,3				14,4	
200			20,2				17,7	
500			21				19,9	
1000			22,3				21,7	

График кривых в ходе ассоциации пептида (фиг. 3А, верхняя вставка) совпадает очень точно, тогда как график кривых диссоциации пептида (фиг. 3А, нижняя вставка) не точно локализуется на экспериментальных кривых. При аппроксимации рассчитали кинетический параметр k_{off} $22,2 \cdot 10^{-3}$ 1/с (табл. 2). Этот параметр описывает время, необходимое для удаления половины связанного пептида. Это означает, что в течение $1/0,0222$ с = 45 с половина введенного пептида удаляется (см. фиг. 3А, нижняя вставка). Поскольку аппроксимация с использованием уравнения Ленгмюра не достаточно хорошо подходит в ходе фазы диссоциации, определение K_D проводили путем аппроксимации значений R_{equ} по концентрации пептида (фиг. 3В) с использованием следующего уравнения: $R_{equ} = R_{max} \times K_A \times c / (1 + K_A \times c)$, R_{equ} , при котором сигналы в равновесии с соответствующей концентрацией с представляют собой переменные, а R_{max} и K_A константы для аппроксимации. K_D можно рассчитать согласно $1/K_A$.

По структурному анализу мышинового Fab-фрагмента клона № 6 антитела сделали заключение о том, что Thr97 в НС может оказывать существенное воздействие на аффинность связывания с АβрЕЗ. После замещения A1a97 на Thr97 в клоне № 6 гуманизированного антитела получили улучшенную аффинность связывания при практически таком же значении K_D по сравнению с клоном № 6 мышинового антитела. Для подтверждения этих результатов с помощью дополнительного измерения ИТС потребовалось большее количество экспрессированного антитела. Поэтому уровень экспрессии повышали за счет замещения сигнальных последовательностей LC и НС варианта Т97 гуманизированного антитела мышинными последовательностями. На второй стадии проводили создание стабильной линии клеток для повышения продуцирования антитела.

В табл. 4 показаны кажущиеся кинетические константы в соответствии с аппроксимацией с использованием уравнения Ленгмюра 1:1 для дополнительных вариантов последовательностей клона № 6 гума-

низированного антитела:

Вариант	K_D (нМ)	k_{on} (c^3M^{-1})	k_{off} (c^{-1})
VH: SEQ ID NO: 24 VL: SEQ ID NO: 14	9,36	$6,16 \times 10^5$	$5,76 \times 10^{-3}$
VH: SEQ ID NO: 27 VL: SEQ ID NO: 14	5,09	$6,35 \times 10^5$	$3,23 \times 10^{-3}$
VH: SEQ ID NO: 27 VL: SEQ ID NO: 15	15,5	$2,67 \times 10^5$	$4,15 \times 10^{-3}$
VH: SEQ ID NO: 27 VL: SEQ ID NO: 13	7,35	$5,62 \times 10^5$	$4,13 \times 10^{-3}$
VH: SEQ ID NO: 70 VL: SEQ ID NO: 14	8,43	$4,23 \times 10^5$	$3,57 \times 10^{-3}$

6. Создание стабильной линии клеток для варианта HC T97 гуманизированного антитела

Для развития стабильной линии клеток сначала создали пул стабильных линий клеток CHO-DG44 путем обработки метотрексатом (MTX) в различных концентрациях. Наилучшую экспрессию в сопровождении небольшого количества умирающих клеток выявляли при концентрации 0,5 мкМ MTX (фиг. 14А, дорожка 2). Таким образом, клетки с предварительной обработкой 0,5 мкМ MTX использовали для селекции клонов по методике предельных разведений.

После селекции клонов выявили сто потенциальных клонов, экспрессирующих антитело. Надосадочную жидкость этих клонов разбавляли 1:20 в буфере HBS-EP и анализировали с помощью SPR с использованием чипа, связывающего АβpE3-18. Калибровочную кривую использовали для определения концентрации антител в надосадочной жидкости. Отделили 18 клонов, которые показали начальную концентрацию антитела, составляющую свыше 0,15 мкг/мл после 3 дней экспрессии. Эти клоны наращивали в 24-луночном формате, и супернатанты собирали и анализировали с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 4В). Пять из этих клонов показали хорошую экспрессию и их дополнительно наращивали до 30 мл встряхиваемой культуры. После 7 дней экспрессии уровень экспрессии измеряли с помощью SPR (фиг. 4С). Клон 9А показал наивысшую концентрацию антител после 7 дней культивирования. Поэтому данный клон использовали для экспрессии больших количеств надосадочной жидкости. Культивирование проводили без дополнительного селекционного давления, чтобы получить более высокую жизнеспособность клеток. Собрали три литра надосадочной жидкости, содержащего антитела.

7. Очистка клона № 6 гуманизированного антитела с помощью хроматографии на белке G

Один литр надосадочной жидкости разбавляли одним литром 40 мМ Na_2HPO_4 pH 7 и наносили в течение ночи на 5 мл колонку с белком G при 4°C. После этого колонку промывали связывающим буфером (20 мМ Na_2HPO_4 , pH 7, фракция А1-А3), а затем высокосольным буфером (2 М NaCl, 40 мМ Na_2HPO_4 pH 7, фракция А4-А7) для удаления неспецифически связанных белков. Антитело элюировали с использованием 0,1 М глицин-HCl, pH 2,7, из колонки и сразу же нейтрализовали с помощью 1 М Tris pH 9. Собирали фракции и 24 мкл загружали в 12% PAGE SDS соответственно. Фракции А12+В1 объединяли и использовали для определения K_D с помощью ИТС. В целом 2,5 мг антитела выделяли из одного литра надосадочной жидкости культуры.

8. Измерение ИТС для клона № 6 гуманизированного антитела с АβpE3-18

Для определения значения K_D клон № 6 гуманизированного антитела разбавляли до концентрации 1 мкМ. Лиганд АβpE3-18 с концентрацией 20 мкМ титровали при 293,15 К. После объединения исходных данных измерения ИТС (фиг. 5В, внизу) рассчитали стехиометрическое отношение 1,5. Расчетное значение K_D составило 2,7 нМ, что достаточно хорошо соответствует значению 5,3 нМ, рассчитанному по данным SPR, характеризующим связывание лиганда вариантом HC T97 гуманизированного антитела клон № 6 в растворе как высокоаффинное взаимодействие. Главным образом взаимодействие обусловлено энтальпическими вкладами ($\Delta H = -23,45$ ккал/моль) и противопоставлено энтропическими штрафами ($\Delta S = -11,96$ ккал/моль), что характерно для структурной перегруппировки в сайте связывания путем образования водородных связей, приводящих к существенной потере степеней свободы.

9. Гуманизация, экспрессия и выделение двух дополнительных клонов №17 и клонов № 24 АβpE3-специфичных антител

Гуманизацию, экспрессию и выделение двух дополнительных клонов № 17 и клонов № 24 АβpE3-специфичных антител проводили с использованием тех же протоколов, материалов и способов, а также экспериментальных условий, которые использовали для клона № 6.

10. Измерение SPR с клоном № 24 и клоном № 17 гуманизированного антитела

Измерения SPR с использованием лиганда pE3-Аβ18 показали, что оба гуманизированных антитела

способны связывать рЕЗ-Аβ-пептид. Константы скорости и значение K_D можно эффективно рассчитать с использованием модели 1:1 аппроксимации с использованием уравнения Ленгмюра. Начальные значения K_D для мышинных антител с рЕЗ-Ар показаны в табл. 5. Стало очевидным, что значение k_{off} для клона № 24 гуманизованного антитела в 20 раз выше, чем значение k_{off} для клона №24 мышинового антитела. Это означает, что после гуманизации рЕЗ-Аβ-пептид быстрее диссоциирует из антигенсвязывающего кармана антитела.

Таблица 5. Определение значения k_{on} , k_{off} и K_D различных Аβ-пептидов

бета-А	последовательность	Ат, клон №	КD в нМ	k_{on} в 1/Мс	k_{off} в 1/с
человеческий рЕЗ-18	рEFRHDSGYEVHHQK LV (SEQ ID NO: 50)	мышинное 6	6,7	6,89E+05	4,58 E-03
		мышинное 24	2,2	1,76E+05	0,38 E-03
		мышинное 17	1,8	19,5E+05	3,46 E-03
		гуманизованное 6	5,3	6,89E+05	4,58 E-03
		гуманизованное 24	16	4,91E+05	7,84 E-03
		гуманизованное 17	1,5	19,9E+05	2,90 E-03
человеческий 1-18	DAEFRHDSGYEVHHQ KLV (SEQ ID NO: 51)	мышинное 6	-	-	-
		мышинное 24	-	-	-
		мышинное 17	-	-	-
		гуманизованное 6	-	-	-
		гуманизованное 17	-	-	-
человеческий 2-18	AEFRHDSGYEVHHQK LV (SEQ ID NO: 52)	мышинное 6	не определена	-	-
		мышинное 24	не определена	-	-
		мышинное 17	490	0,0741E+ 05	3,63 E-03
		гуманизованное	не	-	-
		6	определена		
		гуманизованное 17	190	0,149E+0 5	2,84 E-03
человеческий 4-18	FRHDSGYEVHHQKLV (SEQ ID NO: 53)	мышинное 6	-	-	-
		мышинное 24	-	-	-
		мышинное 17	-	-	-
		гуманизованное 6	-	-	-
		гуманизованное 17	-	-	-

11. Связывание с рецепторами Fc-гамма

Сравнивали связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73, или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с различными рецепторами Fc-гамма (CD16A, CD32A, CD32B и CD64).

Мутант K322A получали с помощью сайт-направленного мутагенеза. Связывание измеряли в биологическом анализе на основе FACS в клетках яичника китайского хомячка (CHO), стабильно экспрессирующих человеческие CD16A, CD32A, CD32B или CD64. Оба антитела инкубировали с каждой линией клеток при 7 разных концентрациях в течение 1 ч с последующей промывкой. Связанные с рецептором H6 или H67 выявляли с помощью конъюгированного с флуорохромом антитела к Fab'. Связывающую способность измеряли с помощью FACS, а K_d и V_{max} рассчитывали с использованием нелинейной регрессии.

Результаты: оба антитела показали сопоставимое связывание со всеми рецепторами. См. фиг. 6, 7, 8 и 9.

12. Связывание с C1q

Сравнивали связывание двух антител, которые содержат или Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73, или его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74), с C1q, чтобы лучше охарактеризовать эффекторные функции антител.

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

- а) прямое связывание двух антител с планшетом, а затем связывание с C1q в растворе и
- б) планшеты, покрытые стрептавидином, сначала инкубировали с биотинилированным рЕ-Аβ-пептидом, связывали с антителами, а затем с C1q.

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

Планшет ELISA покрывали антителом, содержащим Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73, его мутантный вариант K322A (SEQ ID NO: 74) и контроль K322A (hu14.18K322A), который

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

Результаты: антитело, которое содержало Fc-участок дикого типа IgG1 человека под SEQ ID NO: 73, не связывалось с C1q. Его мутантный вариант K322A (содержащий Fc-участок IgG1 под SEQ ID NO: 74), не связывался с C1q. См. также фиг. 10.

13. Иммуногистохимический анализ

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

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

14. Лечение мышей с болезнью Альцгеймера in vivo

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

Эвтаназия и подготовка тканей

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело для связывания на N-конце пироглутаматного варианта бета-амилоидного пептида pE-Aβ_{3-x}, где x определен как целое число от 19 до 42, где переменная часть легкой цепи содержит аминокислотную последовательность

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASICKSSQSLLYSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLT
 YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHTFPFTFGGG
 TKVEIK (SEQ ID NO: 14);

и где гуманизированное антитело содержит участки CDR CDR1 V_L под SEQ ID NO: 12, CDR2 V_L под SEQ ID NO: 9 и CDR3 V_L под SEQ ID NO: 10 в легкой цепи;

и где переменная часть тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVVKKSGASVKVSKASGYSFTGHTMNVWRQAPGQGLEWMGL
 INPSNGVTRYNQKFKGRVTITRDTSTTTVHMELTSLTSEDATYYCTREAKRE
 WDETYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 27);

и где гуманизированное антитело содержит участки CDR

CDR1 V_H: GYSFTGHTMN (SEQ ID NO: 25),

CDR2 V_H: LINPSNGVTRYNQKFGQ (SEQ ID NO: 26);

CDR3 V_H: EAKREWDETY (SEQ ID NO: 20)

в тяжелой цепи.

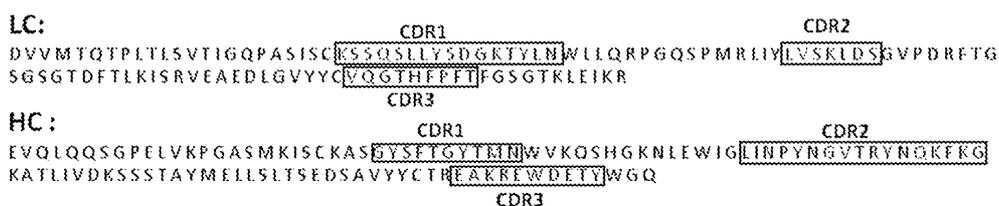
2. Гуманизованное антитело по п.1, где Fc-участок IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 73 и 74.

3. Гуманизованное антитело по п.1 или 2, где переменная часть легкой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 и переменная часть тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27, и Fc-участок IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 74.

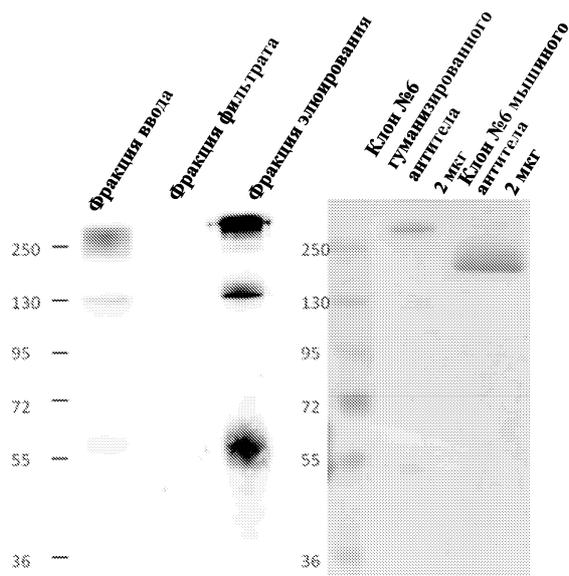
4. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизованное антитело по любому из пп.1-3 и дополнительное биологически активное вещество, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или вспомогательное вещество.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, где указанное дополнительное биологически активное вещество выбрано из усилителей нейронной передачи, психотерапевтических лекарственных средств, ингибиторов ацетилхолинэстеразы, блокаторов кальциевых каналов, биогенных аминов, бензодиазепиновых транквилизаторов, усилителей синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонистов постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов, ингибиторов моноаминоксидазы-A или -B, антагонистов N-метил-D-аспаратных глутаматных рецепторов, нестероидных противовоспалительных лекарственных средств, антиоксидантов и антагонистов серотонинергических рецепторов.

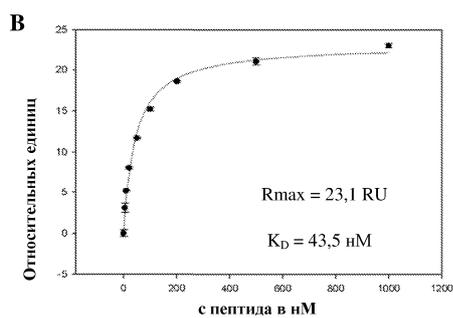
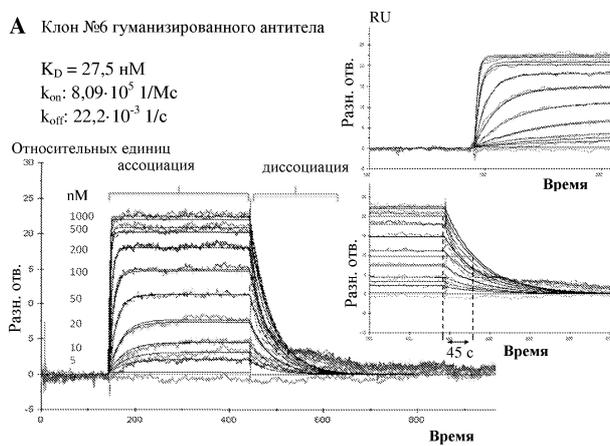
6. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанное дополнительное биологически активное вещество выбрано из группы, состоящей из соединений, эффективных в отношении оксидативного стресса, антиапоптотических соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, таких как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновой кислоты (3 APS), 1,3-пропандисульфоната (1,3PDS), активаторов α-секретазы, ингибиторов β- и γ-секретазы, тау-белков, нейромедиатора, средств для расщепления β-складчатых слоев, аттрактантов клеточных компонентов для выведения/истощения количества бета-амилоида, ингибиторов бета-амилоида с N-концевым усечением, включая пироглутаматный вариант бета-амилоида 3-42, таких как ингибиторы глутаминилциклазы, противовоспалительных молекул или ингибиторов холинэстеразы (ChEI), таких как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, M1-агонистов и других лекарственных средств, включая любые модифицирующие амилоид или тау-лекарственные средства и пищевые добавки, ингибиторы холинэстеразы (ChEI), мемантин или ингибиторы глутаминилциклазы.



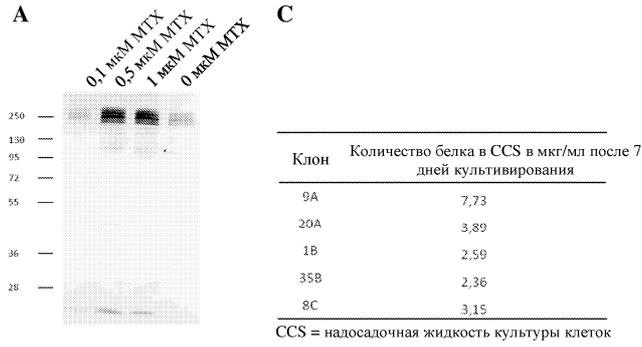
Фиг. 1



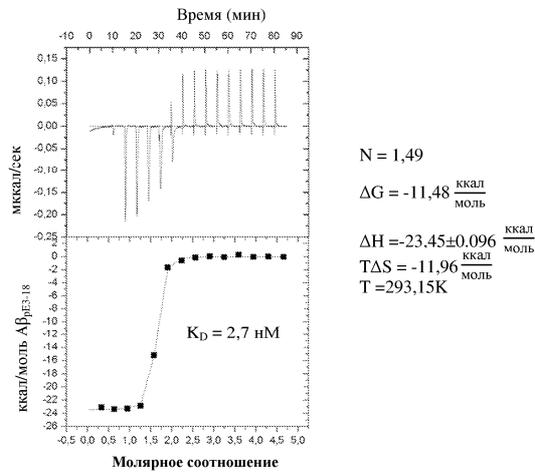
Фиг. 2



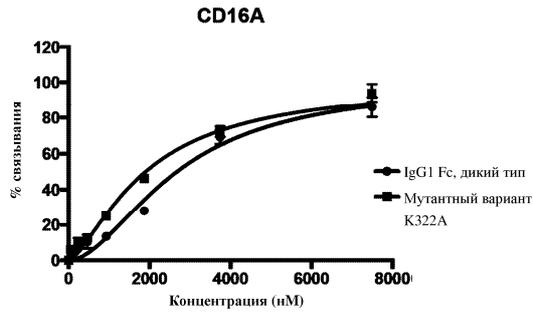
Фиг. 3



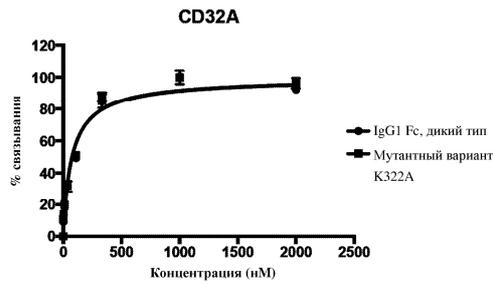
Фиг. 4



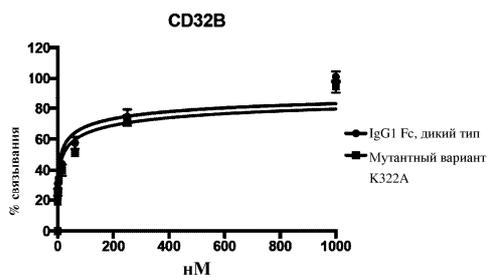
Фиг. 5



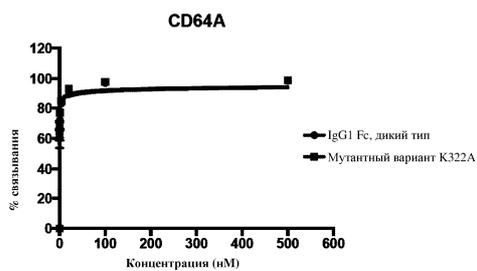
Фиг. 6



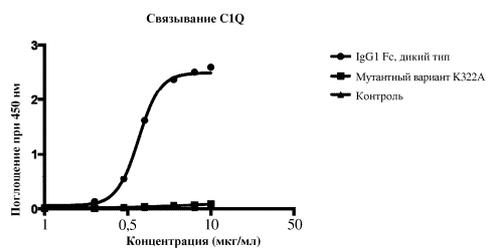
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

