

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190954** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.29

(22) Дата подачи заявки
2019.10.02

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ N-УКОРОЧЕННОГО БЕТА-АМИЛОИДА**

(31) 1816210.7

(32) 2018.10.04

(33) GB

(86) PCT/EP2019/076772

(87) WO 2020/070225 2020.04.09

(71) Заявитель:
ГЕОРГ-АУГУСТ-УНИВЕРЗИТЕТ
ГЕТТИНГЕН ШТИФТУНГ
ЭФФЕНТЛИХЕН РЕХТС,
УНИВЕРЗИТЕТСМЕДИЦИН (DE);
ЛАЙФАРК (GB)

(72) Изобретатель:

Байер Томас (DE), Бакраниа Прити,
Дэвис Сара, Браун Алекс, Мпамханга
Чидо, Мэттьюз Дэвид, Карр Марк,
Холл Гарет (GB)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые связываются с амилоидными пептидами, причем антитела содержат мутации в переменных доменах тяжелой цепи и/или легкой цепи, которые улучшают связывающую активность. Антитела могут быть полезны при лечении болезни Альцгеймера (AD, БА).

A1

202190954

202190954

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567825EA/022

ГУМАНИЗИРОВАННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ N-УКОРОЧЕННОГО БЕТА-АМИЛОИДА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые связываются с амилоидными пептидами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Мышиное антитело к бета-амилоиду (Аβ) NT4X-167 изначально было получено против амилоидного пептида Аβ4-40, и, согласно литературным источникам, оно специфически связывается с N-укороченными амилоидными пептидами АβpE3-42 и Аβ4-42, но не с амилоидным пептидом Аβ1-42. (Antonios et al. *Acta Neuropathol. Commun.* (2013) 6 1 56). Пассивная иммунизация с использованием NT4X-167 показала благоприятный терапевтический эффект на мышиных моделях болезни Альцгеймера (Antonios et al. *Scientific Reports* 5 17338; 2015).

Гуманизированные версии NT4X-167 могут оказаться полезными для клинического применения, например, при лечении болезни Альцгеймера (БА).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что связывающая активность гуманизированных версий антитела NT4X-167 улучшается в случае мутации некоторых остатков в переменных доменах тяжелой цепи и/или легкой цепи. Это можно использовать, например, при разработке молекул-кандидатов для клинического применения.

Первый аспект изобретения относится к анти-Аβ антителу, содержащему переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, где

а) переменный домен тяжелой цепи (домен VH) содержит SEQ ID NO: 2 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях, и

б) переменный домен легкой цепи (домен VK) содержит SEQ ID NO: 6, необязательно с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.

Анти-Аβ антитело может специфически связываться с N-концевыми укороченными амилоидными пептидами (АβpE3-x или Аβ4-x). Например, анти-Аβ антитело может специфически связываться с одним или более, предпочтительно всеми, из АβpE3-38, АβpE3-40, АβpE3-14, АβpE3-42, Аβ4-38, Аβ4-40, Аβ4-14 и Аβ4-42.

Анти-Аβ антитело может не проявлять специфического связывания с полноразмерными амилоидными пептидами или амилоидными пептидами без N-концевых усечений (Аβ1-x), такими как Аβ1-42, Аβ1-38, Аβ1-40 или Аβ1-14.

Предпочтительно переменный домен тяжелой цепи (домен VH) анти-Аβ антитела содержит SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

Предпочтительно переменный домен легкой цепи (домен VL) анти-А β антитела содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

Второй аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно первому аспект и фармацевтически приемлемый носитель.

Третий аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело согласно первому аспект или его переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи.

Четвертый аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту согласно третьему аспект.

Пятый аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту согласно третьему аспект или вектор согласно четвертому аспект.

Шестой аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к способу получения антитела согласно первому аспект, включающий экспрессию вектора согласно четвертому аспект в культуре клеток-хозяев для получения указанного антитела; и выделение антитела из культуры клеток.

Седьмой аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к способу лечения болезни Альцгеймера путем введения нуждающемуся в лечении индивидууму эффективного количества антитела согласно первому аспект или фармацевтической композиции согласно второму аспект.

Восьмой аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к антителу согласно первому аспект или фармацевтической композиции согласно второму аспект для применения в способе лечения организма человека или животного.

Девятый аспект, раскрытый в настоящем описании, относится к антителу согласно первому аспект или фармацевтической композиции согласно второму аспект для применения в способе лечения болезни Альцгеймера у индивидуума.

Эти и другие аспекты и варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, более подробно описаны ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фиг. 1 показано связывание мышинового антитела NT4X-167 с амилоидными пептидами.

На фиг. 2 показано связывание мышинового и химерного антитела NT4X-167 с амилоидными пептидами PSL.

На фиг. 3 показано связывание мышинового, гуманизированного и химерного NT4X-167 с амилоидными пептидами A β rE3-42: первоначальные версии.

На фиг. 4 показано связывание гуманизированных вариантов с A β 1-42.

На фиг. 5 показано связывание гуманизированных вариантов с A β rE3-42.

На фиг. 6 показано связывание гуманизированных антител NT4X-167 второго цикла отбора с пептидом A β rE3-42: версии HC - HR в комбинации с RKA.

На фиг. 7 показано связывание гуманизированных антител NT4X-167 второго цикла отбора с пептидом A β rE3-42, определенное методом ELISA.

На фиг. 8 показано связывание гуманизированных антител NT4X-167 третьего цикла отбора с пептидом A β rE3-42: версии HS - HY в комбинации с RKA.

На фиг. 9 показано связывание гуманизированных антител NT4X-167 пятого цикла отбора с пептидом A β rE3-42: версии rcNT4XS6A, rcNT4XS7A, rcNT4XS8A в комбинации с RKA.

На фиг. 10 показана термостабильность связывания гуманизированного антитела rcNT4X_SA, BA, TA, UA, VA, WA, YA с амилоидным пептидом A β rE3-42.

На фиг. 11 показан анализ теплового сдвига гуманизированных антител rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 12 показаны неспецифические белок-белковые взаимодействия (хроматография для оценки перекрестного взаимодействия).

На фиг. 13 показаны неспецифические белок-белковые взаимодействия (хроматография для оценки перекрестного взаимодействия) ведущего гуманизированного кандидата rcNT4XS7A.

На фиг. 14 показаны очищенные антитела-кандидаты, растворимость которых оценивали.

На фиг. 15 показано связывание гуманизированных антител rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A с амилоидным пептидом PSL A β rE3-42 в сыворотке крови.

На фиг. 16 показано связывание гуманизированных антител rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A с амилоидным пептидом Anaspec A β 4-42 в сыворотке крови.

На фиг. 17 показан уровень защиты первичных эмбриональных нейронов крысы от индуцированной амилоидным пептидом 4-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 18 показан уровень защиты эмбриональных нейронов крысы от индуцированной амилоидным пептидом (A β Glp3) 3-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 19 показан уровень защиты эмбриональных нейронов крысы от индуцированной амилоидным пептидом A β 1-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 20 показан уровень защиты нейронов CNS.4U человека от индуцированной амилоидным пептидом A β 4-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 21 показан уровень защиты нейронов CNS.4U человека от индуцированной амилоидным пептидом A β rE3-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 22 показан уровень защиты нейронов CNS.4U человека от индуцированной амилоидным пептидом A β 1-42 гибели, обеспечиваемый *in vitro* гуманизированными антителами rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A.

На фиг. 23 показано, что оба антитела gcNT4X способны восполнить потерю нейронов в гиппокампе у 6-месячных мышей Tg4-42. Количественная оценка нейронов в CA1 с использованием объективной стереологии. Количество нейронов в гиппокампе шестимесячных мышей Tg4-42 после пассивной иммунизации gcNT4X_SA и gcNT4X_S7A. У мышей Tg4-42, иммунизированных антителами gcNT4X, было обнаружено значительно большее количество нейронов, чем у мышей того же возраста, которым инъецировали IgG1. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими множественными сравнениями с поправкой Бонферрони; $n=5-6$. $*p < 0,05$; $***p < 0,001$; данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (S.E.M.).

На фиг. 24 показано, что gcNT4X_S7A способно наиболее эффективно восполнять потерю нейронов у Tg4-42. Сравнение данных исходного NT4X с gcNT4X_SA и gcNT4X_S7A. Т-тест сравнения NT4X с gcNT4X_S7A. $n=5-7$. $*p < 0,05$; данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M.

На фиг. 25 показано отсутствие существенной разницы между MRCT-контрольным антителом IgG1 по сравнению с контрольными группами IgG2b и PBS. Данные для групп IgG2ba и PBS взяты из Antonios et al. [6]. Ни t-тесты, ни ANOVA не показали значимых различий. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. $n=5-7$.

На фиг. 26 показано, что пассивная иммунизация gcNT4X_S7A устраняет дефицит обучения у мышей Tg4-42. Мыши Tg4-42, которым еженедельно вводили инъекции антитела и контрольного антитела IgG1 (MRCT-контроль) в течение 12 недель. Мышей тестировали в возрасте 6 месяцев в водном лабиринте Морриса. Пространственная долговременная память была нарушена у мышей Tg4-42, получавших контрольное MRCT-антитело, поскольку у них отсутствовало предпочтение в выборе целевого квадранта при испытании зонда. Напротив, у мышей Tg4-42, иммунизированных антителом gcNT4X_S7A, не наблюдали дефицита обучения. $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. $n=8$ на группу. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими множественными сравнениями с поправкой Бонферрони. Целевой квадрант T, левый квадрант L, правый квадрант R, противоположный квадрант O. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M.; $m=$ месяцы.

На фиг. 27 показано, что у иммунизированных мышей 5XFAD уменьшилась нагрузка кортикальных бляшек. Анализ нагрузки бляшек у мышей 5XFAD, иммунизированных gcNT4X_SA и gcNT4X_S7A, по сравнению с мышами 5XFAD, которым вводили IgG1. (a) Иммуноокрашивание пан-специфическим антителом к A β (пан-A β антитело) показало снижение нагрузки бляшками после иммунизации gcNT4X_S7A, но не в группе, иммунизированной gcNT4X_SA. (b) Обе группы, обработанные gcNT4X, показали значительное снижение фибриллярных отложений A β , продемонстрированное окрашиванием тиофлавином S. (c) Иммуноокрашивание анти-A β 1-x антителом показало снижение нагрузки бляшками после иммунизации gcNT4X_S7A, но не в группе, иммунизированной gcNT4X_SA. (d) Иммуноокрашивание антителом к модифицированному пироглутаматом A β 3-x (пироглутамат-A β 3-x), выявило, что оба

антитела гсNT4X уменьшают количество бляшек, однако значимое уменьшение обеспечивало только антитело гсNT4X_S7A, а в случае антитела гсNT4X_SA наблюдали тенденцию к уменьшению. (е) Иммуноокрашивание анти-Аβ4-х антителом выявило, что оба антитела гсNT4X уменьшают количество бляшек. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета множественного сравнения с контрольной группой; n=7-11; ***p <0,001, **p <0,01, *p <0,05, данные представлены в виде среднего значения ± S.E.M.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к открытию того, что связывающая активность гуманизованных версий мышинового антитела NT4X-167 к бета амилоиду (Аβ) значительно улучшается в результате мутации некоторых остатков в переменных доменах.

Раскрытое в настоящем описании анти-Аβ антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL). Переменный домен тяжелой цепи может содержать SEQ ID NO: 2 с четырьмя или меньшим количеством дополнительных аминокислотных мутаций, например замен, делеций или вставок в каркасных областях.

Антитело может специфически связываться с N-концевыми укороченными амилоидными пептидами, например, амилоидными пептидами, модифицированными пироглутаматом (pE) (также называемыми АβpE3-х, АβpGlu3-х, Аβ(Glp3)3-х и p3-х), такими как АβpE3-38, АβpE3-40, АβpE3-14 и АβpE3-42, а также не модифицированными пироглутаматом амилоидными пептидами, такими как Аβ4-38, Аβ4-40, Аβ4-14 и Аβ4-40. Связывание можно определить, например, с помощью раскрытого в настоящем описании анти-Аβ антитела в формате IgG1 с помощью стандартных методов, таких как ELISA или поверхностный плазменный резонанс, как описано ниже.

VH может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; или SEQ ID NO: 2 с, независимо, 1 или более, например 2, 3 или 4 дополнительными аминокислотными изменениями или мутациями в каркасных областях относительно SEQ ID NO: 2 (например, одиночными аминокислотными заменами, делециями или вставками), предпочтительно заменами. Дополнительные аминокислотные изменения или мутации в каркасных областях могут происходить по остаткам, отличным от 27F, 29L, 63R и 70V, предпочтительно по остаткам, отличным от 27F, 29L, 63R, 70V, 52BX₁, 52CX₆, 53X₂, 54X₃, 55X₄ и 56X₅ в SEQ ID NO: 2.

Домен VL может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или SEQ ID NO: 6 с, независимо, 1 или более, например 2, 3 или 4 более аминокислотными изменениями или мутациями в каркасных областях относительно SEQ ID NO: 6 (например, одиночными аминокислотными заменами, делециями или вставками), предпочтительно заменами. Дополнительные аминокислотные изменения или мутации в каркасных областях могут происходить по остаткам, отличным от 92X7 в SEQ ID NO: 6.

Замены могут быть консервативными заменами. Например, раскрытое в настоящем

описании анти-Аβ антитело может содержать домен VH с SEQ ID NO: 3, 4 или 5 необязательно с 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами в каркасных областях. Раскрытое в настоящем описании анти-Аβ антитело может содержать домен VL с SEQ ID NO: 7 или 8 необязательно с 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами в каркасных областях.

Подходящее анти-Аβ антитело может содержать (i) домен VH с SEQ ID NO: 3 и домен VL с SEQ ID NO: 7, (ii) домен VH с SEQ ID NO: 4 и домен VL с SEQ ID NO: 7, (iii) домен VH с SEQ ID NO: 5 и домен VL с SEQ ID NO: 7 (iv) домен VH с SEQ ID NO: 3 и домен VL с SEQ ID NO: 8 (v) домен VH с SEQ ID NO: 4 и домен VL с SEQ ID NO: 8 и/или (vi) домен VH с SEQ ID NO: 5 и домен VL с SEQ ID NO: 8. Некоторые предпочтительные анти-Аβ антитела могут содержать домен VH с SEQ ID NO: 5 и домен VL с SEQ ID NO: 8.

Термины «иммуноглобулин» и «антитело» могут использоваться взаимозаменяемо для обозначения любого белка, содержащего антигенсвязывающий участок антитела, который обладает способностью специфически связываться с одним или более антигенами.

«Антиген» представляет собой объект (например, белковый объект или пептид), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент). Антигены раскрытых в настоящем описании анти-Аβ антител могут включать N-укороченные амилоидные пептиды AβpE3-42 и Aβ4-42.

Нативные антитела обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины размером примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, причем разные изоформы антител различаются количеством дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержат регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики.

Антитела содержат глобулярные области полипептидов тяжелой или легкой цепей, называемые «доменами». Домен может содержать пептидные петли, обычно от 3 до 4 петель, которые стабилизированы, например, β-складчатым листом и/или внутрицепочечными дисульфидными связями. Домены обычно называют «константными» или «вариабельными» на основании относительного отсутствия изменений последовательности внутри доменов различных представителей класса в случае «константного» домена или значительных изменений внутри доменов различных представителей класса в случае «вариабельной» области. «Домены» антител или полипептидов в данной области техники часто взаимозаменяемо называют «областями» антител или полипептидов.

«Константные» домены легкой цепи антитела могут называться «константными областями легкой цепи», «константными доменами легкой цепи», областями «CL» или доменами «CL». «Константные» домены тяжелой цепи антитела могут называться «константными областями тяжелой цепи», «константными доменами тяжелой цепи», областями «CH» или доменами «CH». Константный домен легкой цепи совмещен с первым константным доменом тяжелой цепи.

Константный домен тяжелой цепи, который содержит хвостовую часть антитела,

называется в настоящем описании Fc-доменом (кристаллизующийся фрагмент) или Fc-областью. Fc-область может взаимодействовать с Fc-рецепторами на клеточной поверхности и некоторыми белками системы комплемента, посредством чего антитело может активировать иммунную систему. Fc-области содержат три константных домена тяжелой цепи в каждой полипептидной цепи.

«Вариабельные» домены легкой цепи антитела могут называться «вариабельными областями легкой цепи», «вариабельными доменами легкой цепи», областями «VL» или доменами «VL» («L» в данном случае относится к «легкой» цепи, а не к изотипу легкой цепи «лямбда»). «Вариабельные» домены тяжелой цепи антитела могут называться «вариабельными областями тяжелой цепи», «вариабельными доменами тяжелой цепи», областями «VH» или доменами «VH». Интактные легкие цепи имеют, например, два домена (VL и CL), и интактные тяжелые цепи имеют, например, четыре или пять доменов (VH, CH1, CH2 и CH3).

Вариабельные домены легкой и тяжелой цепей включают «гипервариабельные области» (HVR или HV), также известные как «определяющие комплементарность области» (CDR), последовательности которых являются гипервариабельными и которые могут формировать структурно определенные петли. Обычно антитела содержат шесть гипервариабельных областей; три в тяжелой цепи (H1, H2, H3) и три в легкой цепи (L1, L2, L3), распределенные между относительно консервативными каркасными областями (FR). В раскрытых в настоящем описании антителах аминокислотные последовательности вариабельных доменов показаны ниже. CDR могут быть легко идентифицированы в этих последовательностях с помощью стандартных методов (см., например, Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesmann, K.S & Foeller, C. (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services). Согласно номенклатуре Кабат (Kabat) VHCDR1 занимает положения 31-35, VHCDR2 занимает положения 50-65, VHCDR3 занимает положения 95-102, VLCDR1 занимает положения 24-34, VLCDR2 занимает положения 50-56, и VLCDR3 занимает положения 89-97.

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий участок. Термин «антигенсвязывающий участок» относится к участку, который специфически связывается (иммунореагирует с) антигеном. Раскрытые в настоящем описании антитела содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, предпочтительно содержат два антигенсвязывающих участка. Антигенсвязывающий участок сформирован из CDR тяжелой и CDR легкой цепей, которые выровнены по каркасным областям и обеспечивают связывание со специфическим эпитопом. «Антигенсвязывающая область» или «антигенсвязывающий домен» представляет собой область или домен антитела, который включает связывающий участок антитела. Раскрытые в настоящем описании антитела имеют по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, который распознает амилоидные пептиды A β рЕ3-42 и A β 4-42.

Встречающиеся в природе цепи антител или рекомбинантно полученные цепи антител могут быть экспрессированы с лидерной последовательностью, которая удаляется во время клеточного процессинга с образованием зрелой цепи. Зрелые цепи также могут быть получены рекомбинантным способом, содержащим не встречающуюся в природе лидерную последовательность, например, для усиления секреции или изменения процессинга конкретной представляющей интерес цепи.

Константные области тяжелой и легкой цепей антитела могут демонстрировать фенотипическую изменчивость. Легкие цепи антитела классифицируют как каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константной области легкой цепи, и их длина составляет примерно 230 остатков. Раскрытое в настоящем описании антитело включает легкую каппа-цепь (вариабельный домен легкой цепи каппа обозначен в настоящем описании как VK).

Тяжелые цепи человека и высших млекопитающих, длина которых составляет примерно 450-600 остатков, подразделяют на классы гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) и эпсилон (ϵ), которые определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Существует два подкласса IgM (H и L), три подкласса IgA (IgA1, IgA2 и секреторный IgA) и четыре подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Раскрытое в настоящем описании антитело предпочтительно представляет собой антитело иммуноглобулина G (IgG). Раскрытое в настоящем описании антитело более предпочтительно представляет собой антитело IgG4 или антитело IgG1 с минимальной эффекторной функцией.

Раскрытые в настоящем описании антитела могут содержать тяжелые цепи, которые принадлежат к любому из изотипов иммуноглобулинов, раскрытых в настоящем описании. Раскрытые в настоящем описании антитела могут содержать последовательности более чем одного класса или изотипа.

Раскрытое в настоящем описании анти-A β антитело может проявлять цитотоксическую активность. В таком антителе константный домен обычно представляет собой фиксирующий комплемент константный домен и обычно относится к классу IgG1. Примером являются изотипы IgG1 и IgG4 человека.

Раскрытое в настоящем описании антитело может содержать фрагмент цельного антитела. Термин «фрагмент» относится к части или участку антитела или цепи антитела, содержащей меньшее количество аминокислотных остатков, чем интактное или полноразмерное антитело, или цепь антитела, причем указанная часть предпочтительно сохраняет по меньшей мере одну, предпочтительно большую часть или все функции, обычно ассоциированные с этой частью, когда она присутствует в интактном антителе. Фрагменты могут быть получены путем химической или ферментативной обработки интактного или полноразмерного антитела или цепи антитела. Фрагменты также можно получить рекомбинантными способами.

Фрагменты раскрытых в настоящем описании антител могут связываться с антигеном или конкурировать с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из

которого они были получены) за связывание с антигеном (т.е. специфическое связывание). Раскрытые в настоящем описании антитела связываются с амилоидными пептидами Аβ_{рЕ3-42} и Аβ₄₋₄₂. Связывающие фрагменты получают методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов.

Раскрытые в настоящем описании антитела могут существовать в виде связывающих фрагментов, включая, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, химически связанный F(ab')₂, моноспецифический Fab₂, биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₂, моновалентный IgG, scFv (одноцепочечный переменный фрагмент), ди-scFv (двухвалентный scFv), биспецифическое диатело, триспецифическое триатело, scFv-Fc, минитело или sdAb (однодоменное антитело), и сохраняют способность связывать амилоидные пептиды Аβ_{рЕ3-42} и Аβ₄₋₄₂.

Раскрытое в настоящем описании антитело может быть частью биспецифического или триспецифического антитела. Биспецифическое антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных антигенсвязывающих участка; триспецифическое антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее три разные пары тяжелой/легкой цепей и три разных антигенсвязывающих участка. Биспецифические и триспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Иммунол. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). Типичное антитело, раскрытое в настоящем описании, может быть биспецифическим антителом, содержащим по меньшей мере два разных антигенсвязывающих участка.

Специфическое связывание относится к ситуации, при которой антитело не проявляет никакого существенного связывания с молекулами, которые отличаются от его специфического эпитопа на антигене. Термин также применим, например, когда антигенсвязывающий домен является специфическим к конкретному эпитопу, который содержат несколько антигенов, и в этом случае антитело, несущее антигенсвязывающий домен, будет способно связываться с различными антигенами, несущими этот эпитоп.

Раскрытые в настоящем описании анти-Аβ антитела или нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, могут находиться в выделенном состоянии. Антитела и нуклеиновые кислоты могут быть свободными или могут практически не содержать материал, с которым они связаны в природе, такой как другие полипептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в своей естественной среде, или среде, в которой они получены (например, культуре клеток), в случае их получения с помощью методов рекомбинантной ДНК, применяемых *in vitro* или *in vivo*. Антитела и нуклеиновая кислота могут находиться в составе с разбавителями или адъювантами и, тем не менее, для практических целей могут быть выделены; например, антитела как правило могут быть смешаны с желатином или другими носителями, если они используются для покрытия микротитровальных планшетов, предназначенных для использования в иммуноанализах, или могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями,

если используются в диагностике или терапии.

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует антитело или его легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL, как раскрыто в настоящем описании. Нуклеиновая кислота может, например, кодировать переменный домен тяжелой цепи (домен VH), содержащий SEQ ID NO: 2, такая как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и/или переменный домен легкой цепи (домен VK), содержащий SEQ ID NO: 6, такая как SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, как описано выше. Необязательно, кодируемый домен VH и/или домен VL может иметь до четырех дополнительных аминокислотных мутаций в каркасной области.

Нуклеиновые кислоты могут включать последовательности ДНК и РНК, в которых нуклеиновые основания тимина замещены урацилом.

Раскрытое в настоящем описании антитело может быть получено путем рекомбинантной экспрессии. Нуклеиновые кислоты, как описано выше, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей, необязательно связанные с константными областями, могут быть вставлены в векторы экспрессии. Векторы, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, раскрытые в настоящем описании, сами по себе являются аспектом изобретения. Легкие и тяжелые цепи могут быть клонированы в один или разные векторы экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие раскрытые в настоящем описании цепи антител, могут быть функционально связаны с одной или более контрольными последовательностями в векторе(ах) экспрессии, которые обеспечивают экспрессию цепей антител. Последовательности контроля экспрессии включают, без ограничения, промоторы (например, промоторы, ассоциированные в естественных условиях, или гетерологичные промоторы), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительно последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева (например, клетки COS, CHO или Expi293). Такие векторы могут быть включены в подходящего хозяина, при этом хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, а также для сбора и очистки антител.

Аспекты изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело, раскрытое в настоящем описании; вектору, предпочтительно вектору экспрессии, содержащему одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют раскрытое в настоящем описании антитело; и вектору, содержащему одну или более функционально связанных с промотором нуклеиновых кислот, которые кодируют раскрытое в настоящем описании антитело. Примеры векторов экспрессии представляют собой pNuK и pNuG1, которые в комбинации с нуклеиновыми кислотами, раскрытыми в настоящем описании, содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, раскрытые в настоящем описании. Также можно использовать другие векторы, которые обеспечивают нуклеотидные последовательности, кодирующие константные области легкой и тяжелой

цепей антитела.

Векторы экспрессии для использования, как раскрыто в настоящем описании, обычно реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде составной части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры (например, устойчивости к ампициллину, устойчивости к гигромицину, устойчивости к тетрациклину, устойчивости к канамицину или устойчивости к неомицину), что позволяет обнаружить клетки, трансформированные требуемыми последовательностями ДНК (см., например, Itakura et al. US4704362).

Клетки-хозяева можно трансформировать векторами экспрессии и культивировать в обычных питательных средах, подходящих для индукции промоторов, отбора трансформантов и/или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Клетка-хозяин, содержащая описанную выше нуклеиновую кислоту или вектор предоставляется в качестве аспекта изобретения.

Другой аспект изобретения относится к способу получения раскрытого в настоящем описании антитела, причем способ включает экспрессию в культуре клеток-хозяев раскрытого в настоящем описании вектора для получения указанного антитела и выделение антитела из культуры клеток. Этот способ может включать перенос вектора, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело или цепи антитела, как описано выше, в клетку-хозяина, представленную в настоящем описании, выращивание культуры клетки-хозяина в условиях, позволяющих экспрессию нуклеиновой кислоты(кислот) и извлечение экспрессированного антитела. Может быть использован любой подходящий способ, известный в данной области.

Микроорганизмы-хозяева, подходящие для использования при клонировании и экспрессии нуклеиновых кислот и векторов, раскрытых в настоящем описании, включают прокариотических хозяев; *Escherichia coli*, бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и других энтеробактерий, таких как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах можно также создавать векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Помимо этого, может присутствовать любое количество из множества хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система из фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности, и имеют последовательности участка связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для векторов, используемых в прокариотических клетках, также может потребоваться компонент начала репликации.

Для экспрессии нуклеиновых кислот или векторов, раскрытых в настоящем описании, также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. *Saccharomyces* является предпочтительным дрожжевым хозяином с подходящими векторами, содержащими последовательности контроля экспрессии (например,

промоторы), точку начала репликации, последовательности терминации и т.п., при необходимости. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые промоторы дрожжей включают, помимо прочего, промоторы алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферменты, ответственные за утилизацию мальтозы и галактозы.

Помимо микроорганизмов, для экспрессии нуклеиновых кислот или векторов, раскрытых в настоящем описании, и получения полипептидов антител (например, полинуклеотидов, кодирующих антитела или их фрагменты) также может быть использована культура клеток ткани млекопитающих (см. например, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY 1987). Эукариотическая клетка-хозяин или клетка-хозяин млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, раскрытые в настоящем описании, сама по себе является аспектом изобретения. На самом деле, эукариотические клетки являются предпочтительными, поскольку в данной области техники было разработано несколько подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать гетерологичные белки (например, интактные антитела), которые включают линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки Expi293, клетки ExpiСНО, линии клеток миеломы или трансформированные В-клетки или гибридомы. Клетки могут быть человеческими или отличными от человеческих, например, клетками млекопитающих, отличных от человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетки представляют собой человеческие клетки Expi293. Антитела, раскрытые в настоящем описании, могут быть продуцированы в клеточных линиях, сконструированных для продуцирования афукозилированных белков, такие как клеточная линия Potelligent® СНОК1SV (BioWa/Lonza), клетки, сконструированные GlymaxX® (ProBioGen), или линия эмбриональных стволовых клеток утки EB66 (Valneva). Векторы экспрессии для клеток млекопитающих обычно включают, без ограничения, одно или более из следующего: сигнальную последовательность, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и необходимые участки информации процессинга, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительные последовательности контроля экспрессии представляют собой промоторы, происходящие из генов иммуноглобулинов, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота, цитомегаловируса и т.п. (см., например, Co et al., *J. Immunol.* 148:1149-1992).

Раскрытый в настоящем описании вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине также может кодировать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце цепи зрелого антитела или полипептида. Подходящие сигнальные последовательности могут быть гетерологичными и могут распознаваться и подвергаться процессингу (т.е. расщепляться сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнал gD простого герпеса.

Альтернативно, раскрытые в настоящем описании последовательности, кодирующие антитела, могут быть включены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, Deboer et al., US5741957, Rosen, US5304489 и Meade et al., US 5849992). Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легких и/или тяжелых цепей, функционально связанные с промотором и энхансером, полученными из гена, специфического для молочной железы, такого как казеин или β -лактоглобулин.

Раскрытые в настоящем описании векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина разными хорошо известными способами, которые подбираются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекция хлоридом кальция обычно используется для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция, электропорация, липофекция, биолистика или трансфекция на основе вирусов могут использоваться для других клеток-хозяев. (См. в целом Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 4 ed., 2012). Другие методы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают использование полибрана, слияние протопластов, липосомы, электропорацию и микроинъекцию (см. в целом Sambrook et al., см. выше). Для получения трансгенных животных трансгены можно вводить путем микроинъекции в оплодотворенные ооциты или можно включать в геном эмбриональных стволовых клеток, а ядра таких клеток переносить в энуклеированные ооциты.

При клонировании тяжелой и легкой цепей в отдельные векторы экспрессии векторы котрансфицируют для обеспечения экспрессии и сборки интактных антител, раскрытых в настоящем описании. После экспрессии цельные антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулинов, раскрытые в настоящем описании, могут быть очищены с помощью процедур, стандартных в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, использование колонок аффинной хроматографии, колоночную хроматографию, очистку ВЭЖХ, гель-электрофорез и т.п. (см. в целом Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, (1982))). Для фармацевтического применения согласно настоящему изобретению предпочтительны по существу чистые антитела с гомогенностью по меньшей мере примерно 90-95%, и наиболее предпочтительна гомогенность 98-99% или более. Можно использовать стандартные методы очистки белков, известные в данной области. Примерами подходящих процедур очистки белков являются следующие процедуры: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или на ионообменной колонке, катионообменная смола, такая как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация.

Раскрытые в настоящем описании антитела могут быть получены любым подходящим способом, включая способы, представленные в настоящем описании, а также

другими способами, известными в данной области. Раскрытые в настоящем описании антитела могут быть получены в промышленных масштабах с помощью способов, которые хорошо зарекомендовали себя в данной области для крупномасштабного производства антител. Например, могут использоваться рекомбинантные системы экспрессии, такие как раскрыто в настоящем описании.

Раскрытое в настоящем описании антитело может специфически связываться с амилоидными пептидами АβpE3-42 и Аβ4-42. Антитело может не проявлять специфического связывания или практически не связываться с амилоидным пептидом Аβ1-42. Раскрытое в настоящем описании антитело также может проявлять желательные структурные, физические, биофизические и химические свойства, описанные ниже со ссылкой на примеры.

Сродство антитела, раскрытого в настоящем описании, представляет собой степень или силу связывания антитела с эпитопом или антигеном. Константа диссоциации K_d и константа сродства K_a являются количественными показателями сродства. K_d представляет собой отношение скорости диссоциации антитела (k_{off}), насколько быстро оно отделяется от своего антигена, к скорости ассоциации антитела (k_{on}) антитела, насколько быстро оно связывается со своим антигеном. Связывание антитела с антигеном является обратимым процессом, и скорость реакции связывания пропорциональна концентрациям реагентов. В равновесии скорость образования комплекса [антитело][антиген] равна скорости диссоциации на компоненты [антитело] + [антиген]. Измерение констант скорости реакции можно использовать для определения константы равновесия или сродства, K_a ($K_a=1/K_d$). Чем меньше значение K_d , тем больше сродство антитела к мишени. Большинство антител имеют значения K_d в диапазоне от низких микромолярных (10^{-6}) до наномолярных (от 10^{-7} до 10^{-9}) значений. Обычно считается, что антитела с высоким сродством находятся в низком наномолярном диапазоне (10^{-9}), а антитела с очень высоким сродством находятся в пикомолярном диапазоне (10^{-12}).

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь константу скорости ассоциации (k_{on}), равную по меньшей мере $2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или по меньшей мере $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь скорость диссоциации антитела (k_{off}) менее $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$, менее 10^{-1}s^{-1} , менее $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$, менее 10^{-2}s^{-1} или менее $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$.

В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, связывается (например, специфически) с амилоидными пептидами АβpE3-42 и Аβ4-42 с константой сродства или K_a , составляющей по меньшей мере 10^2 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^3 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^4 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^5 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^6 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ или по меньшей мере 10^7 M^{-1} .

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь константу диссоциации или K_d из комплекса с амилоидными пептидами АβpE3-42 и Аβ4-42, составляющую менее $5 \times 10^{-$

2 M , менее 10^{-2} M , менее $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, менее 10^{-3} M , менее $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, менее 10^{-4} M , менее $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, менее 10^{-5} M , менее $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, менее 10^{-6} M или менее $5 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Специфическое связывание антитела означает, что антитело проявляет заметное сродство к конкретному антигену или эпитопу и, как правило, не проявляет значительной перекрестной реактивности. Антитело, которое «не проявляет значительной перекрестной реактивности», представляет собой антитело, которое не будет в значительной степени связываться с нежелательным объектом (например, с нежелательным белковым объектом). Антитело, специфическое к конкретному эпитопу, будет, например, незначительно перекрестно реагировать с удаленными эпитопами того же белка или пептида. Специфическое связывание, то есть k_{off} , k_{on} , K_a и K_d антитела, раскрытого в настоящем описании, может быть определено любыми признанными в данной области способами определения такого связывания.

Антитело может связываться с амилоидными пептидами А β 4-42 или А β рЕ3-42 со сродством связывания по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сродства связывания мышинового антитела NT4X-167 с амилоидным пептидом А β 4-42 или А β рЕ3-42, измеренного с помощью ELISA. Подходящие методы ELISA хорошо известны в данной области. Например, иммобилизованный амилоидный пептид может контактировать с антителом в формате IgG1 с последующей промывкой один или более раз 0,1% неионным детергентом, таким как полисорбат 20 (Твин 20), для удаления несвязанного антитела. Антитело, связанное с иммобилизованным пептидом, затем может быть обнаружено с помощью любого удобного метода, например, с использованием вторичного антитела, связанного с детектируемой меткой, такой как HRP.

Раскрытое в настоящем описании антитело может быть термостабильным, т.е. раскрытое в настоящем описании антитело может связываться с амилоидными пептидами (А β рЕ3-42 и А β 4-42) при температурах от 30°C до 85°C, в частности до 75°C. Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь температуру плавления от 50°C до 100°C, конкретно от 60 до 80°C, более конкретно примерно 66-67°C.

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь низкую склонность к агрегации. Склонность к агрегации может быть проанализирована с помощью стандартных методов, таких как многоугловое рассеяние света или динамическое рассеяние света. Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь низкую склонность к неспецифическим межбелковым взаимодействиям и хорошую растворимость.

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь низкую склонность к агрегации в концентрированном состоянии. Раскрытый в настоящем описании состав может содержать антитело, концентрированное до 50-200 мг/мл, например 75-150 мг/мл, предпочтительно 80-120 мг/мл и более предпочтительно 90-110 мг/мл, с предпочтительной концентрацией примерно 100 мг/мл, без образования растворимых агрегатов в водном растворе, поддерживаемом при физиологическом pH, например, с помощью PBS Дульбекко.

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь низкую склонность к агрегации при многократном замораживании и оттаивании или при длительном хранении при температурах выше нормальной температуры тела. Например, температура длительного хранения составляет 50°C в течение 30 дней в PBS Дульбекко.

Раскрытое в настоящем описании антитело может иметь изоэлектрическую точку (pI) в пределах от pH 8,6 до pH 9, предпочтительно от pH 8,1 до pH 8,7.

Раскрытое в настоящем описании антитело может сохранять способность связываться с амилоидными пептидами A β Е3-42 и A β 4-42 после инкубации при 37°C в сыворотке мыши, человека и/или яванского макака. Например, раскрытое в настоящем описании антитело может сохранять способность связываться с A β Е3-42 или A β 4-42 после инкубации в сыворотке мыши, человека и/или яванского макака в течение 10-50 дней, предпочтительно 20-40 дней, более предпочтительно 30 дней. Антитело, которое сохраняет связывающую способность, может проявлять такую же или практически такую же связывающую способность при 37°C, что и антитело, которое не инкубировали в сыворотке или которое инкубировали в контрольном растворе.

Раскрытое в настоящем описании анти-A β антитело может быть агликозилированным. Fc-области IgG антител несут высококонсервативный участок N-гликозилирования, и гликозилирование Fc-фрагмента необходимо для активности, опосредованной Fc-рецептором. Углеводные части N-gly, присоединенные к этому участку, представляют собой преимущественно фукозилированные по ядру двухантенные структуры сложного типа. Кроме того, небольшие количества этих N-гликанов также несут бисектный GlcNAc и α -2,6-связанные остатки сиаловой кислоты. В агликозилированном антителе может отсутствовать один или несколько углеводных фрагментов в силу, например, химического или ферментативного процесса, отсутствия или мутации одного или более участков гликозилирования или экспрессии в бактериях.

Раскрытое в настоящем описании анти-A β антитело может быть модифицировано для усиления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). ADCC - это клеточно-опосредованная реакция, при которой неспецифические цитотоксические клетки (например, клетки - естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Такая клетка может быть клеткой человека. Обычно считается, что ADCC активность антител требует связывания Fc-области антитела с рецептором антитела, находящимся на поверхности эффекторной клетки, такой как, например, клетка-киллер, естественная клетка-киллер и активированный макрофаг. Изменяя фукозилирование (например, путем уменьшения или устранения) углеводной структуры гуманизированного антитела (т.е. в Fc-области), ADCC активность антитела может быть усилена *in vitro*, например, в 10 раз или 20 раз, или 30 раз, или 40 раз, или 50 раз, или 100 раз, или 500 раз, или 600 раз, или 700 раз, или 1000 раз по сравнению с немодифицированным гуманизированным антителом. Из-за повышенной ADCC активности такие модифицированные антитела можно использовать в более низких дозах, чем их

немодифицированные аналоги, и, как правило, они вызывают у пациентов меньшее количество побочных эффектов или более слабые побочные эффекты.

Анти-А β антитело, раскрытое в настоящем описании, можно использовать при комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). CDC включает центральную врожденную систему комплемента, которая действует в качестве эффектора адаптивного иммунитета. Классический путь CDC запускается связыванием молекул антитела с антигеном на клетке-мишени и инициируется связыванием белка C1q с Fc-доменом связанного антитела. Получаемый в результате каскад комплемента активирует путь мембранной атаки, приводя к образованию комплекса мембранной атаки, который индуцирует лизис клетки-мишени. Для повышения способности раскрытого в настоящем описании антитела запускать CDC оно может быть модифицировано любым способом, известным в данной области техники, таким как, без ограничения, конструирование остова белка, содержащего аминокислотные замены в константных доменах тяжелой цепи антитела. Пример комбинации аминокислотных замен в IgG1, используемых для усиления активности CDC, см. в Moore et al., MAbs, 2(2), 181-189 (2010). CDC-активность модифицированного антитела, раскрытого в настоящем описании, может быть усилена, например, в 10 раз или 20 раз, или 30 раз, или 40 раз, или 50 раз, или 100 раз, или 500 раз, или 600 раз, или 700 раз, или 1000 раз по сравнению с немодифицированным гуманизированным антителом.

Анти-А β антитела могут быть дополнительно модифицированы химически, например, ПЭГилированием, или включением в липосомы, для улучшения их фармацевтических свойств, например, путем увеличения периода полувыведения *in vivo*.

Раскрытое в настоящем описании анти-А β антитело может быть приготовлено в виде состава и/или введено в виде фармацевтической композиции, содержащей активное терапевтическое антитело и ряд других фармацевтически приемлемых компонентов, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (22-е изд., Pharmaceutical Press, London, PA (2013)). Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции также могут включать, в зависимости от требуемого состава, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители или разбавители, которые определены как носители, обычно используемые для приготовления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель подбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав также могут включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п.

Фармацевтические композиции, содержащие раскрытое в настоящем описании анти-А β антитело, также могут включать большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (такие как функционализированная латексом СефарозаTM, агароза, целлюлоза и т.п.), полимерные аминокислоты, сополимеры

аминокислот и липидные агрегаты (такие как масляные капли или липосомы). Кроме того, эти носители могут действовать как иммуностимулирующие агенты (т.е. адъюванты).

Для парентерального введения антитела или композиция, раскрытые в настоящем описании, могут вводиться в виде инъекционных доз раствора или суспензии вещества в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может быть стерильной жидкостью, такой как водные масла, физиологический раствор, глицерин или этанол. Кроме того, в композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества, буферные вещества pH и т.п. Другими компонентами фармацевтических композиций являются компоненты нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло и минеральное масло. Как правило, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для растворов для инъекций. Антитела можно вводить в форме депо-инъекции или препарата-имплантата, который может быть составлен для обеспечения замедленного высвобождения активного ингредиента.

Термин «парентеральный», в контексте настоящего описания, включает подкожное, внутривенное, внутрикожное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное и интратекальное введение антитела или композиции, раскрытых в настоящем описании. Анти-Аβ антитело или композиция, раскрытые в настоящем описании, также могут вводиться назальным способом или внутривнутрижелудочно.

Обычно композиции готовят в виде инъекций либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий; также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования перед инъекцией в жидких носителях. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактидные, полигликолидные или сополимерные, для усиления адъювантного эффекта, как обсуждалось выше (см. Langer, *Science* 249:1527 (1990) и Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97 (1997)). Агенты по настоящему изобретению можно вводить в форме депо-инъекции или препарата-имплантата, который может быть составлен для обеспечения замедленного или пульсирующего высвобождения активного ингредиента.

Дополнительные составы, подходящие для других способов введения, включают пероральные, интраназальные и легочные составы, суппозитории и трансдермальные аппликации. Пероральные составы включают наполнители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, целлюлозы и карбоната магния. Эти композиции имеют форму растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, составов с замедленным высвобождением или порошков и содержат 10-95% активного ингредиента, предпочтительно 25-70%.

Местное применение позволяет обеспечить трансдермальную или внутрикожную доставку. Местному введению может способствовать одновременное введение агента с холерным токсином или его обезвреженными производными или субъединицами или

другими подобными бактериальными токсинами (см. Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). Совместное введение может быть достигнуто путем использования компонентов в виде смеси или в виде связанных молекул, полученных путем химической сшивки или путем экспрессии в виде слитого белка. Альтернативно, трансдермальная доставка может быть достигнута с помощью кожного пластыря или трансферосом (Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25:3521 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15 (1998)).

Предпочтительно, раскрытое в настоящем описании анти-А β антитело или композицию, содержащую раскрытое в настоящем описании анти-А β антитело, можно вводить внутривенно (IV) или внутримышечно (IM).

Композиции могут содержать раскрытое в настоящем описании анти-А β антитело, фармацевтически приемлемые носители, представленные в настоящем описании, и другие терапевтические агенты, в частности профилактические или терапевтические агенты, полезные для профилактики, ведения или лечения болезни Альцгеймера (БА, AD). Такие терапевтические агенты могут включать обезболивающие, противовоспалительные, противовирусные, лекарственные вещества, которые уменьшают лихорадку или снижают повышенную температуру тела, терапевтические соединения, предназначенные для обезболивания, например жидкости для полоскания рта или спреи, которые могут притуплять боль во рту, и терапевтические средства, улучшающие когнитивные функции, такие как мемантин, донепезил, галантамин и ривастигмин. Раскрытая в настоящем описании композиция может дополнительно включать композиции для регидратации субъекта, например, с помощью внутривенной терапии.

Композиции, раскрытые в настоящем описании, могут содержать нуклеиновые кислоты, т.е. ДНК или РНК, кодирующие анти-А β антитело, раскрытое в настоящем описании, и любой способ доставки таких нуклеиновых кислот с любыми другими соединениями композиции, представленными выше, или без них. Композиции могут также содержать векторы, например, без ограничения, векторы экспрессии, раскрытые в настоящем описании, которые в свою очередь содержат раскрытые в настоящем описании нуклеиновые кислоты.

Композиции, раскрытые в настоящем описании, могут содержать вирусные векторы, используемые в качестве систем доставки нуклеиновых кислот в клетки. Подходящие системы доставки нуклеиновых кислот на основе вирусных векторов включают ретровирусные системы, аденовирусные векторы, вирусные векторы из семейства оспы, включая вирус осповакцины и вирусы оспы птиц, и вирусные векторы из рода альфа-вирусов. Нуклеиновая кислота, кодирующая раскрытое в настоящем описании антитело или вектор, содержащий ее, могут быть упакованы в липосомы для доставки индивидууму или в клетку, которые могут быть включены в описанные композиции. Векторы и нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, также могут быть адсорбированы или связаны с носителями в виде частиц.

Композиции, раскрытые в настоящем описании, могут содержать векторы для генной терапии, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие

антитела, раскрытые в настоящем описании, или полипептидные цепи «голых» антител согласно изобретению. Композиции могут содержать такие векторы или полипептиды в комбинации с антителами, раскрытыми в настоящем описании, и любыми другими компонентами композиции, описанными выше.

Раскрытое в настоящем описании антитело можно использовать в наборе. Термин «набор» используется в отношении комбинации реагентов и других материалов, которые облегчают анализ образцов. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании набор для иммуноанализа включает подходящий антиген, связывающий агент, содержащий детектируемый фрагмент, и детектирующие реагенты. В набор также может быть включена или не включена, система для усиления сигнала, генерируемого детектируемыми фрагментами. Кроме того, в других вариантах осуществления набор включает, без ограничения, такие компоненты, как устройство для сбора образцов, пробирки для образцов, держатели, лотки, стойки, чашки, планшеты, инструкции для пользователя набора, растворы или другие химические реагенты и образцы, которые могут использоваться для стандартизации, нормализации образцов и/или в качестве контрольных образцов.

Наборы могут содержать по меньшей мере одно раскрытое в настоящем описании антитело. Набор может включать композицию, раскрытую в настоящем описании, в одном или более контейнерах, необязательно с одним или более другими профилактическими или терапевтическими агентами, полезными для профилактики, контроля или лечения болезни Альцгеймера (БА). Если композиция, содержащая компоненты для введения, не предназначена для доставки через пищеварительный канал, например, для пероральной доставки, может быть включено устройство, выполненное с возможностью доставлять компоненты набора каким-либо другим путем, например, шприц. Набор может дополнительно включать инструкции по профилактике, лечению, контролю или облегчению БА, а также побочных эффектов, и информацию о дозировке для способа введения.

Настоящее изобретение также относится к диагностическим наборам. Раскрытые в настоящем описании антитела могут быть полезны для мониторинга, диагностики или обеспечения прогноза развития или прогрессирования БА и могут использоваться в наборе, подходящем для таких целей. Раскрытое в настоящем описании антитело можно использовать в диагностическом наборе для детектирования наличия N-укороченного амилоидного пептида, такого как A β Е3-42 или A β 4-42, в образце жидкости организма, полученном от индивидуума, причем индивидуум может представлять собой человека или млекопитающее, такое как примат, не являющийся человеком, или лабораторное животное, включая мышей, крыс и кроликов. Образец жидкости организма, такой как, помимо прочего, кровь, сыворотка или спинномозговая жидкость (CSF), берут у человека и тестируют на наличие N-укороченных амилоидных пептидов с помощью раскрытых в настоящем описании антител. Измерение уровней амилоидного пептида в крови индивидуума с помощью раскрытого в настоящем описании антитела позволяет получить

информацию о восприимчивости, риске развития, диагнозе или прогнозе БА у индивидуума или информацию о подходящих схемах введения или дозах антитела или композиции, раскрытых в настоящем описании, для лечения человека. Диагностические методы обычно выполняют *in vitro*. Способ детектирования наличия N-укороченного амилоидного пептида в образце, полученном от индивидуума, может включать приведение образца в контакт с раскрытым в настоящем описании анти-А β антителом и определение связывания антитела с одним или более пептидами в образце.

Набор, который применим для описанной выше диагностики может содержать раскрытые в настоящем описании антитела, которые связаны с определяемым веществом, включая, помимо прочего: различные ферменты для использования в анализах, включая EIA и ELISA, такие как, без ограничения, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как, без ограничения, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; частицы, такие как латексные гранулы или бактерии, для использования в тестах на агглютинацию; флуоресцентные материалы, такие как, без ограничения, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин, флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, помимо прочего, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, без ограничения, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как, помимо прочего, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In) и технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn и ^{117}Sn ; позитронно-излучающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографов, нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов и молекулы, меченные радиоактивными метками или конъюгированные с определенными радиоизотопами. Любая детектируемая метка, которую можно легко измерить, может быть конъюгирована с раскрытым в настоящем описании антителом и использоваться для диагностики заболевания согласно тому, как раскрыто в настоящем описании. Детектируемое вещество может быть связано или конъюгировано либо непосредственно с антителом, либо опосредованно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер, известный в данной области) с помощью методов, известных в данной области. Ионы металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в качестве диагностических средств, известны в данной области (см., например, US474900).

Детектирование антигена с помощью любого из описанных выше методов или детектируемых веществ может дать положительный результат на наличие амилоидного пептида А β рЕ3-42 или А β 4-42 с помощью раскрытых в настоящем описании антител в наборе, как раскрыто в настоящем описании, и позволяет диагностировать человека, как имеющего БА, или получить прогностическую информацию о человеке, страдающем БА или имеющем риск развития БА. Такой человек может впоследствии нуждаться в лечении

БА и/или пройти курс лечения, как раскрыто в настоящем описании.

Аспекты изобретения направлены, помимо прочего, на лечение болезни Альцгеймера (БА) и других заболеваний и расстройств, связанных с БА, а также других неврологических заболеваний, характеризующихся растворимыми амилоидами. Аспекты изобретения также относятся к способу лечения БА, включая профилактику, путем введения нуждающемуся в лечении индивидууму эффективного количества антитела или композиции, раскрытой в настоящем описании. Антитело или композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция (например, композиция, содержащая раскрытое в настоящем описании антитело, фармацевтически приемлемый наполнитель и необязательно дополнительный терапевтический агент), раскрытые в настоящем описании, могут быть использованы в способе лечения организма человека или животного. Антитело или композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем описании, может быть использована в способе лечения организма человека или животного, причем лечение представляет собой терапевтическое или профилактическое лечение БА у индивидуума.

Вышеупомянутые способы лечения могут включать введение индивидууму антитела или композиции (например, композиции, содержащей раскрытое в настоящем описании антитело, фармацевтически приемлемый наполнитель и необязательно дополнительный терапевтический агент), раскрытой в настоящем описании, в условиях, которые вызывают благоприятный терапевтический ответ у индивидуума, например, для профилактики или лечения БА.

Такой человек может страдать БА. Раскрытые в настоящем описании способы лечения могут применяться как в отношении бессимптомных пациентов, так и пациентов, у которых в текущий момент времени проявлены симптомы БА. Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить человеку, у которого нет БА, с целью ее профилактики. Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить индивиду, у которого отсутствуют или не проявлены симптомы БА. Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить индивиду, который уже страдает или, по-видимому, страдает БА. Лица, поддающиеся лечению, включают лиц, подверженных риску или восприимчивых к БА, но у которых не проявлены симптомы, и лиц, подозреваемых на наличие БА, а также лиц, у которых в текущий момент времени проявлены симптомы. Раскрытые в настоящем описании антитела можно вводить населению в целом с целью профилактики без необходимости какой-либо оценки риска для отдельного индивидуума. В некоторых вариантах осуществления люди, подходящие для лечения, как раскрыто в настоящем описании, могут включать людей с ранним началом БА или одним или более ее симптомами, а также людей, у которых в образце жидкости организма, такой как CSF, обнаружен амилоидный пептид.

Термины «лечить», «лечащий» или «лечение» (или грамматически эквивалентные термины) означают, что тяжесть состояния человека уменьшается или по меньшей мере частично улучшается или облегчается и/или что достигается некоторое облегчение,

смягчение или уменьшение по меньшей мере одного клинического симптома, и/или наблюдается ингибирование или задержка прогрессирования состояния, и/или предотвращение или задержка начала заболевания или недомогания.

Раскрытое в настоящем описании антитело, которое можно использовать в способе лечения БА, может представлять собой антитело с любой последовательностью и любого формата, которые раскрыты в настоящем описании, которое специфически связывается с N-укороченными амилоидными пептидами A β Е3-42 и/или A β 4-42. Антитела, используемые в способах лечения, раскрытых в настоящем описании, могут быть фрагментами раскрытых в настоящем описании антител, например антигенсвязывающими фрагментами. Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить индивиду с БА.

Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить нуждающемуся в лечении индивиду с помощью фармацевтического носителя или фармацевтической композиции, или любой композиции, раскрытой в настоящем описании. Альтернативно, антитело можно вводить индивиду путем введения полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере одну цепь антитела. Полинуклеотид экспрессируется с образованием цепи антитела у пациента. Необязательно, полинуклеотид кодирует тяжелую и легкую цепи антитела. Полинуклеотид экспрессируется с образованием тяжелых и легких цепей у индивидуума.

Раскрытое в настоящем описании антитело можно использовать в способе профилактики или лечения БА, который включает введение пациенту эффективной дозы раскрытого в настоящем описании антитела. В контексте настоящего описания термин «эффективное количество» или «эффективная доза», или «достаточное количество» (или грамматически эквивалентные термины) раскрытого в настоящем описании терапевтического антитела относится к количеству антитела или композиции, раскрытой в настоящем описании, которое эффективно для получения требуемого эффекта, который необязательно является терапевтическим эффектом (т.е. путем введения терапевтически эффективного количества). Например, «эффективное количество» или «эффективная доза», или «достаточное количество» может быть таким, которое обеспечивает уменьшение или по меньшей мере частичное улучшение или облегчение тяжести состояния индивидуума, например БА, и/или достижение некоторого облегчения, смягчения или уменьшения по меньшей мере одного клинического симптома и/или ингибирование или задержку прогрессирования БА и/или предотвращение или задержку начала БА.

Термины «пациент», «индивидуум» или «субъект» включают людей и других млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение одним или более агентами (например, иммунотерапевтическими агентами или антителами), раскрытыми в настоящем описании. Субъекты-млекопитающие включают приматов, например приматов, отличных от человека. Субъекты-млекопитающие также включают лабораторных животных, обычно используемых в исследованиях, таких как, помимо прочего, кроликов и грызунов, таких как крысы и мыши.

Количество антитела или композиции, раскрытых в настоящем описании,

адекватное для проведения терапевтического или профилактического лечения, определяется как эффективная доза, например терапевтически или профилактически эффективная доза. Как в случае профилактических, так и в случае терапевтических режимов лечения реагенты можно вводить несколькими дозами до тех пор, пока не будет достигнут достаточный иммунный ответ. Термин «иммунный ответ» или «иммунологический ответ» включает развитие гуморального (опосредованного антителами) и/или клеточного (опосредованного антиген-специфическими Т-клетками или продуктами их секреции) ответа, направленного против антигена у субъекта-реципиента. Обычно иммунный ответ контролируют и, если иммунный ответ начинает ослабевать, назначают повторные дозы.

Эффективные дозы раскрытых в настоящем описании композиций для лечения описанных выше состояний меняются в зависимости от множества различных факторов, включая способы введения, целевой участок, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные вещества, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но можно лечить и других млекопитающих, например приматов, не относящихся к человеку, кроликов, крыс и мышей, включая трансгенных млекопитающих. Дозировки лечения необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности.

Для пассивной иммунизации антителом, раскрытым в настоящем описании, дозировка находится в диапазоне от примерно 0,01 до 100 мг/кг и обычно от 0,1 до 50 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять по меньшей мере 1 мг/кг массы тела или по меньшей мере 10 мг/кг массы тела или находиться в пределах диапазона 1-100 мг/кг. В другом примере дозировки могут составлять по меньшей мере 0,5 мг/кг массы тела или по меньшей мере 50 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 0,5-50 мг/кг, предпочтительной является дозировка по меньшей мере 5 мг/кг. В предпочтительном примере дозировки могут составлять примерно 50 мг/кг.

Раскрытые в настоящем описании способы могут включать введение антитела субъекту в виде одной дозы, двух или более доз. Доза антитела может составлять от примерно 100 мкг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от примерно 300 мкг/кг до 60 мг/кг массы тела пациента или от примерно 10 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или согласно любому другому графику, определенному эмпирическим анализом. Лечение может включать введение нескольких доз в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере, в течение шести месяцев. Дополнительные схемы лечения могут включать введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз каждые 3-6 месяцев. Типичные схемы дозирования включают 1-20 мг/кг или 15 мг/кг при ежедневном введении, 30 мг/кг при введении через день или 60 мг/кг при еженедельном введении.

Раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или

ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными в зависимости от измеренных уровней анти-Аβ антитела в крови пациента. В некоторых способах дозировку корректируют для достижения концентрации антител в плазме 1-1000 мкг/мл, и в некоторых способах - 25-300 мкг/мл. Альтернативно, раскрытое в настоящем описании антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота меняются в зависимости от периода полувыведения антитела из организма пациента. В целом гуманизированные антитела демонстрируют более длительный период полувыведения, чем химерные и нечеловеческие антитела.

Дозировка и частота введения могут меняться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях композиции, содержащие раскрытые в настоящем описании антитела или их коктейль, вводят пациенту, еще не находящемуся в болезненном состоянии, для повышения устойчивости пациента. Такое количество определяют как «эффективная профилактическая доза». В этом случае точные количества снова зависят от состояния здоровья пациента и общего иммунитета, но обычно составляют от 0,1 до 25 мг на дозу, особенно от 0,5 до 2,5 мг на дозу. Относительно низкая доза вводится через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени.

Дозы нуклеиновых кислот, кодирующих раскрытые в настоящем описании антитела, меняются в пределах от примерно 10 нг до 1 г, от 100 нг до 100 мг, от 1 мкг до 10 мг или от 30 до 300 мкг ДНК на пациента. Дозы для инфекционных вирусных векторов меняются в пределах от 10 до 100 и более вирионов на дозу.

Антитела и композиции, раскрытые в настоящем описании, можно вводить для терапевтического и/или профилактического лечения парентеральными, местными, внутривенными, пероральными, желудочными, подкожными, внутриартериальными, внутричерепными, внутрибрюшинными, интраназальными или внутримышечными способами, как раскрыто в настоящем описании. Для введения антител предпочтительны внутримышечная инъекция или внутривенная инфузия.

Другими аспектами и вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем описании, являются аспекты и варианты осуществления, описанные выше, в которых термин «содержащий» заменен термином «состоящий из», и аспекты, и варианты осуществления, описанные выше, в которых термин «содержащий» заменен термином «по существу состоящий из».

Следует понимать, что в заявке раскрыты все комбинации любых из вышеупомянутых аспектов и описанных выше вариантов осуществления, если из контекста не следует иное. Аналогично в заявке раскрыты все комбинации предпочтительных и/или необязательных признаков либо по отдельности, либо вместе с любым другим аспектом, если из контекста не следует иное.

Модификации вышеупомянутых вариантов осуществления, дополнительные варианты осуществления и их модификации будут очевидны специалисту при

ознакомлении с настоящим описанием, и, как таковые, они находятся в пределах объема, раскрытого в настоящем описании.

Все документы и записи в базах данных последовательностей, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в виде ссылки для всех целей.

Положения остатков антител, приведенные в настоящем описании, пронумерованы в соответствии со схемой, описанной у Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesmann, K.S & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services. При необходимости положение замены может быть описано относительно остатка, пронумерованного по Кабат, который инвариантен в последовательностях иммуноглобулина. Альтернативные схемы нумерации антител описаны в Honegger, A and Plückthun A. (2001). J. Mol. Биол 309, 657-67.

«И/или» в контексте настоящего описания следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или по отдельности. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждое из них было изложено в настоящем описании отдельно.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

1. Получение РНК из клеток гибридом

Замороженные гранулы мышинных гибридомных клеток NT4X-167, предоставленные компанией Thomas Bayer, хранившиеся при -80°C , обрабатывали с помощью набора Qiagen RNeasy Kit для выделения РНК в соответствии с протоколом производителя.

2. Синтез 1-й нити кДНК.

РНК NT4X-167 (~26 мкг) подвергали обратной транскрипции для получения кДНК с помощью набора для синтеза 1-й нити кДНК GE Life Sciences в соответствии с протоколом производителя. Эту процедуру повторяли два раза с получением 3 независимых продуктов кДНК NT4X-167 (циклы 1, 2 и 3), чтобы можно было обнаружить и исключить наличие мутаций кДНК, индуцированных обратной транскриптазой.

3. Определение последовательности кДНК

кДНК NT4X-167 амплифицировали с помощью ПЦР в 3 отдельных реакциях. кДНК иммуноглобулина амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами легкой цепи каппа плюс МКС или праймерами тяжелой цепи плюс смесь МНС, используя мастер-микс для ПЦР Phusion Flash High-Fidelity. Результатом каждой реакции ПЦР был один продукт амплификации, который очищали с помощью набора для очистки QIAquick PCR и секвенировали (GATC Biotech) в обоих направлениях с использованием праймеров M13-Forward и M13-Reverse для получения трех независимых наборов информации о последовательностях для каждой цепи иммуноглобулина.

4. ДНК последовательностей VK и VH NT4X-167.

Консенсусную последовательность ДНК ПЦР-продукта VK NT4X-167 обозначили как VK NT4X-167, а консенсусную ДНК-последовательность ПЦР-продукта VH NT4X-167 обозначили как VH NT4X-167, которые представлены в SEQ ID NO 9-12, соответственно. Анализ последовательностей NT4X-167 с использованием зародышевой линии показал, что легкая цепь каппа представляет собой мышиную MKV4, а тяжелая цепь - мышиную MHV7.

5. Конструирование химерных векторов экспрессии NT4X-167

Конструирование химерных векторов экспрессии подразумевает клонирование амплифицированных переменных областей в векторы IgG/каппа (pHuK и pHuG1) путем независимого от лигазы клонирования (LIC). Векторы (модифицированные pCMV) расщепляли с помощью BfuA1 (BspM1), и затем генерировали совместимые липкие концы с 3'-5'-экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы T4 (+ dATP). Последовательности антител получали путем первой амплификации переменной области с помощью ПЦР из кДНК NT4X-167 с праймерами, содержащими 3'-конец лидерной последовательности (большая часть последовательности присутствует в векторе), прямой праймер, или содержащими начало константной области (IgG1 или каппа), обратный праймер, за которым следует начало переменной области (в каждом направлении). Комплементарные липкие концы создавали в продуктах ПЦР обработкой ДНК-полимеразой T4+dTTP. Вектор и вставки инкубировали при комнатной температуре, трансформировали в химически компетентные бактерии TOP10 и высевали на чашки с канамицином. Было выделено несколько клонов, и колонии подвергли скринингу с помощью ПЦР с использованием праймеров HCMVi и HuG1 LIC Rev для VH или HuK LIC Rev для VK. Клоны, генерирующие продукты ПЦР правильного размера, отбирали, подвергали обработке с помощью минипрепаративного набора QIAGEN и секвенировали с использованием тех же праймеров.

6. Генерация химерных антител

Суспендированные клетки Expi293, растущие в среде для трансфекции Expi293 с антибиотиками, котрансфицировали cNT4X-167 VH.pHuG1 и cNT4X-167 VK.pHuK (по 1 мкг ДНК) с помощью реагента ExpiFectamine 293. Клетки выращивали в ростовой среде объемом 1 мл в течение 5 дней. В кондиционированной среде с помощью ELISA было определено до 81 мкг/мл химерного антитела NT4X-167.

7. Амилоидные пептиды

Амилоидные пептиды A β 1-42, A β pE3-42 и 4-42 приобретали в компании Peptide Specialty Laboratories (PSL) или California peptides.

8. Трансгенные мыши

Трансгенная гомозиготная линия мышей Tg4-42^{hom} (далее именуемая Tg4-42) и линия

5XFAD, использованные в этом исследовании, описаны ранее [1,2].

10. Пассивная иммунизация

Потенциальные терапевтические эффекты клонированных в обратной ориентации (rc) гуманизированных антител NT4X (rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A) изучали с помощью

пассивной иммунизации на мышах Tg4-42 и 5XFAD. Пассивную иммунизацию выполняли путем внутрибрюшинных инъекций и сравнивали с контрольной группой с использованием антител того же класса иммуноглобулинов, к которым принадлежали оба антитела rcNT4X (IgG1, контрольное антитело MRCT).

Самцов и самок мышей Tg4-42 иммунизировали инъекциями антител в дозе 10 мг/кг массы тела, разведенных в стерильном PBS (pH 7,4). Мыши получали еженедельные инъекции, начиная с трехмесячного возраста. Каждая мышь получила в общей сложности 12 инъекций. Тестирование поведения выполняли между 10-й и 11-й инъекциями. После последней инъекции животных умерщвляли. Контрольная группа получала внутрибрюшинные инъекции контрольного MRCT-антитела IgG1 (10 мг/кг массы тела). Животных умерщвляли после последней инъекции в возрасте 6 месяцев.

Шестинедельным самкам мышей 5XFAD еженедельно вводили инъекции rcNT4X_SA и rcNT4X_S7A (10 мг/кг массы тела, разведенные в стерильном PBS) или MRCT-контроль (IgG1; 10 мг/кг массы тела, разведенные в стерильном PBS). Каждая мышь получила в общей сложности 12 внутрибрюшинных инъекций. Животных умерщвляли после последней инъекции в возрасте 18 недель.

Контрольные группы обрабатывали также как терапевтические группы.

11. Оценка пространственной долговременной памяти с помощью водного лабиринта Морриса

Пространственную долговременную память у мышей Tg4-42 оценивали с помощью водного лабиринта Морриса [3], как описано ранее [2].

12. Количественная оценка нейронов с помощью объективной стереологии

Стереологический анализ выполняли, как описано ранее [2, 4]. На срезах, окрашенных крезоловым фиолетовым, очерчивали слой клеток гиппокампа CA1 (Bregma от -1,22 до -3,52 мм) и анализировали с помощью стереологической рабочей станции (Olympus BX51 с моторизованным предметным столиком для автоматического отбора образцов), StereoInvestigator 7 (MicroBrightField, Уиллистон, США) и масляной линзой 100x (NA=1,35).

13. Иммуногистохимия и гистология

Образцы мышинных тканей обрабатывали, как описано ранее [5]. Для окрашивания для оценки нагрузки бляшками использовали следующие антитела: антитело 1-57 (пироглутамат-Аβ3-х, 1:5000, мышинное моноклональное [5]), антитело 80С2 (к Аβ1-Х, Synaptic Systems Göttingen, 1:500, мышинное моноклональное), поликлональное антитело 24311 (к пан-Аβ, 1:500, кроличье [2]) и поликлональное антитело 029 (к Аβ4-х; 1:500; морской свинки). Биотинилированные вторичные антикроличьи и антимишские антитела (1:200) приобретали у ДАКО. Окрашивание визуализировали с помощью метода АВС с использованием набора Vectastain (Vector Laboratories) и диаминобензидина в качестве хромогена. Контрастное окрашивание выполняли гематоксилином. Для окрашивания DAPI срезы депарафинизировали и промывали PBS с последующей инкубацией в 4',6'-диамидин-2'-фенилиндоле (DAPI, 1 мкг/мл) в течение 1 мин. Для флуоресцентного окрашивания

тиофлавином S срезы ткани депарафинизировали и регидратировали, дважды промывали деионизированной водой, обработанной 1% (мас./об.) тиофлавином S в водном растворе, и контрастировали 1% (мас./об.) водным раствором 4',6-диамидин-2'-фенилиндола. Срезы заключали в водную флуоресцентную монтирующую среду (DAKO).

14. Количественная оценка нагрузки A β

У иммунизированных мышей 5XFAD определяли количество бляшек. Для каждого животного использовали три залитых парафином среза, которые находились на расстоянии не менее 40 мкм друг от друга. Относительную нагрузку бляшками в коре головного мозга оценивали с помощью микроскопа Olympus BX-51, оснащенного камерой Olympus DP-50 и программой ImageJ (НИН, США). Систематически делали репрезентативные изображения с 20-кратным увеличением. Изображения преобразовывали в двоичную форму в 8-битные черно-белые изображения с помощью ImageJ, и устанавливали фиксированный порог интенсивности, определяющий окрашивание DAB. Измеряли процент площади, окрашенной DAB, а также количество зерен на мм² и средний размер зерен.

15. Статистический анализ

Различия между группами проверяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими множественными сравнениями с поправкой Бонферрони, ANOVA с последующим тестом Даннета множественного сравнения или t-критерием Стьюдента, как указано. Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (SEM), как указано. Все статистические данные рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 5.04 для Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

16. Одобрение исследований

Эксперименты на животных были одобрены местными органами по защите животных (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) под регистрационным номером 17/2447. Эксперименты проводили в соответствии с утвержденными протоколами.

17. ELISA

Каждую лунку 96-луночного планшета MaxiSorp (Nunc) покрывали аликвотами по 50 мкл 200 нг/мл амилоидных пептидов 1-42, pE3-42 или 4-42 в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки промывали 3 раза PBS-T (0,1% Твин 20) и блокировали 150 мкл 5% молока в PBS/0,05% Твин 20 на лунку. Затем лунки инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 часа и промывали 3 раза PBS-T (0,1% Твин 20). 50 мкл первичного антитела, серийно разведенного в 1% молока в PBS/0,05% Твин 20, добавляли в лунки аналитического планшета, используя серию трехкратных разведений, начиная с ~100 мкг/мл. Затем повторяли этапы инкубации и промывки. HRP к человеческой цепи каппа (Sigma A7164-1 мл) разбавляли в 4000 раз в PBS/1% молоко/0,05% Твин 20 и добавляли по 50 мкл в каждую лунку. Стадии инкубации и промывки повторяли, и затем добавляли 75 мкл субстрата K-Blue (Neogen) на лунку и инкубировали в течение 5-10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл раствора RED

STOP (Neogen) в каждую лунку, и считывали оптическую плотность при 650 нм.

Результаты

Создание химерной версии антитела NT4X-167

Связывание амилоидных пептидов A β 1-42, A β rE3-42 и 4-42 с химерным антителом NT4X-167 измеряли с помощью ELISA и сравнивали с исходным мышинным антителом NT4X-167. Химерное антитело NT4X-167 связывалось с пептидом A β rE3-42 в анализе ELISA, и не связывалось с пептидами A β 1-42 или 4-42 (фиг. 2), при значениях EC₅₀, сопоставимых со значениями для мышинового антитела NT4X-167 (фиг. 1).

Для получения дополнительной характеристики связывания мышинных и химерных антител NT4X-167 с амилоидными пептидами выполняли анализ SPR с помощью Biacore T200 (GE Healthcare). Химерное антитело NT4X-167 связывалось с пептидами A β rE3-42 и 4-42, но не связывалось с A β 1-42 с сопоставимыми кажущимися значениями K_D, также как и исходное мышинное антитело NT4X-167. Последовательность NT4X-167 использовали для создания гуманизированной версии анти-NT4X-167 антитела.

Разработка вариантов гуманизированных антител NT4X-167

Базы данных кДНК человеческих VH и VK

Для формирования базы данных последовательностей иммуноглобулинов человека при выравнивании согласно нумерации по Кабат использовали последовательности белков иммуноглобулинов человека и мыши из Международной иммуногенетической базы данных 2009⁹ и базы данных последовательностей белков Kabat Release 5, представляющих иммунологический интерес (последнее обновление 17 ноября 1999 г.)⁸. Полученная база данных содержала 10406 последовательностей VH и 2894 последовательностей VK.

Молекулярная модель NT4X-167

Рассчитывали модель гомологии переменных областей мышинового антитела NT4X-167. Атомные координаты 2DQU_L.pdb и 1WEJ_H.pdb служили в качестве шаблона последовательности с наивысшей оценкой для VL и VH, соответственно, согласно данным анализа Blast базы данных структур антител pdb компании Accelrys, а атомные координаты 1YNL_LH.pdb служили в качестве шаблона всей (интерфейсной) последовательности с наивысшей оценкой. Эти шаблоны использовали для создания 20 исходных моделей; модель с наивысшей оценкой уточняли путем моделирования каждой петли CDR, используя для нее 5 лучших шаблонов петель. Двадцать окончательных моделей использовали для определения комплементарных остатков, которые находятся в пределах 4Å от петель CDR.

Выбор человеческого каркаса

Используя различные критерии отбора, оценивали базы данных человеческих VH и VK применительно к последовательностям VH и VK белка NT4X-167. Идентифицировали остатки FW в пределах 4Å от остатков CDR (определение по Кабат) в структурах мышинового антитела NT4X-167 и обозначали как «остатки в пределах 4Å».

Гуманизированные последовательности и неполные последовательности удаляли из анализа. Последовательность AF062228 выбирали в качестве кандидата-донора

человеческой тяжелой цепи. Эта последовательность имеет высокие показатели идентичности и сходства последовательности и не имеет соматических мутаций относительно зародышевой линии. AF062228 имеет восемь измененных остатков в пределах 4Å (таблицы 1 и 2).

Аналогичным образом, выбирали последовательность AY942002 в качестве кандидата-донора человеческой легкой цепи каппа (таблица 4). AY942004, AF054661 и AF113887 были отвергнуты из-за количества соматических мутаций в каркасах. AJ698329 была отклонена из-за замены G->Q в Каркасе 4. Все остальные рассматриваемые последовательности были очень похожими, но у AY942002 идентичность и сходство каркаса с NT4X_VK были лучше. AY942002 не имела соматических мутаций относительно зародышевой линии и содержала три возможных изменений в пределах 4Å (таблица 4).

Разработка RHA и RHB NT4X-167

После идентификации подходящей человеческой каркасной области стало возможным сконструировать синтетический белок и последовательность ДНК. Первоначальная разработка гуманизированной версии NT4X-167 заключалась в прививке CDR 1, 2 и 3 из NT4X-167 VH в акцепторную FW AF062228 с получением варианта NT4X-167 RHA. Затем восемь остатков в пределах 4Å подвергали обратной мутации в эквивалентные мышинные остатки, тем самым создавая вариант RHB NT4X-167, мутацию осуществляли по одной в следующих вариантах: сборку последовательностей осуществляли *in silico* и обозначали как RHA - RHJ NT4X-167. В таблицах 1-3 приведены сравнения мышинной и гуманизированной версий последовательностей VH белка NT4X-167. Все гуманизированные варианты клонировали в векторы pMoG1 и pMoK, для обеспечения возможности очистки антител от этих конструкций для исследований *in vivo* на нескольких мышинных моделях (5XFAD и Tg4-42). Полученные ведущие гуманизированные кандидаты можно клонировать в векторы pHuG4 и pHuK.

Разработка RKA NT4X-167 и RKB NT4X-167

Каркас из AY942002 использовали для создания ДНК и белка для гуманизированных конструкций. CDR 1, 2 и 3 из VK NT4X-167 прививали к акцепторной FW AY942002 для получения начальной версии гуманизированной RKA NT4X-167. RKA NT4X-167 содержала три неспаренных остатка в пределах 4Å, которые подвергли обратной мутации в эквивалентные мышинные остатки в варианте RKB NT4X-167. Эти остатки подвергали обратной мутации по одному в следующих вариантах: сборку последовательностей осуществляли *in silico* и обозначали как RKA - RKE NT4X-167 (таблица 4).

Получение гуманизированных антител NT4X-167

Гены HA, HB, KA и KB NT4X-167 синтезировали с помощью GenScript. Сборку природных человеческих каркасных последовательностей AF062228 и AY942002, тяжелых и легких цепей, соответственно, и природных мышинных последовательностей CDR осуществляли *in silico* и обозначали RHA - RHJ NT4X-167 и RKA - RKE NT4X-167. Используя программные алгоритмы, запатентованные GenScript, последовательности RHA/RHB и RKA/RKB оптимизировали путем введения «молчащих» мутаций для

использования кодонов, которые преимущественно используются в человеческих клетках, и выполняли синтез. Конструкции RKA/RKB и RHA/RHB амплифицировали с помощью ПЦР со специфическими праймерами для вектора экспрессии+вставка (как описано ранее для химерных версий) и вводили в pMoK и pMoG1, соответственно, посредством независимого от лигазы клонирования и использовали для трансформации бактерий TOP10. Версию HA впоследствии модифицировали путем мутагенеза с помощью ПЦР для получения других гуманизованных вариантов, приведенных в таблице 4.

Клоны секвенировали и плазмидную ДНК получали с помощью набора QIAGEN Plasmid Miniprep Kit или Qiagen Plasmid Maxiprep Kit. Последовательности конструкций для экспрессии (HA, HB, KA и KB) приведены в SEQ ID NO: 13-20. Препараты экспрессионных плазмид, кодирующие (гуманизованные или химерные) VH и VK, использовали для трансфекции клеток Expi293, которые культивировали в течение 5-7 дней в бессывороточной среде, после чего собирали кондиционированную среду, содержащую секретлируемое антитело.

Экспрессия антител

Концентрации антител IgG₁k в кондиционированной среде клеток Expi293 измеряли с помощью ELISA. Большинство антител продуцировались с хорошими уровнями экспрессии.

Связывание антигена с начальными версиями (цикл 1 и цикл 2) гуманизованных антител NT4X-167

Данные, приведенные на фиг. 3, показывают связывание тяжелых цепей RHA/RHB в комбинации с вариантами легких цепей RKA/RKB гуманизованного антитела NT4X-167 с амилоидными пептидами A β 1-42 и A β rE3-42. Никакого различия в связывании между версиями, содержащими версию RKA или RKB легкой цепи каппа, не наблюдали, что означает, что обратные мутации, введенные в KB, не являются существенными для связывания. Версия RHA не показала связывания с амилоидными пептидами, а гуманизованные версии, содержащие версию RHB, связывались с A β rE3-42. Принимая во внимание эти данные, была отобрана только легкая цепь KA, и были синтезированы дополнительные версии гуманизованной тяжелой цепи с помощью набора для мутагенеза Stratagene QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), с получением версий RHC-RHJ NT4X (Таблица 1). Результаты связывания гуманизованных версий RHC-RHJ с пептидом A β rE3-42. Полученные методом ELISA, показаны на фиг. 5. Гуманизованные версии RHB/RKA и RHB/RKB связывались с пептидом A β rE3-42, в то время как другие гуманизованные версии не показали никаких признаков связывания; выполняли третий цикл синтеза гуманизованных вариантов.

Связывание антигена с гуманизованными антителами NT4X-167 третьего и четвертого циклов

Получали гуманизованные варианты RHK - RHR тяжелой цепи NT4X-167 третьего цикла (таблица 2). Варианты RHK-RHR получали с помощью набора для мутагенеза Stratagene (QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit).

Тяжелые цепи RHC-RHR объединяли с версией RKA легкой цепи, и выполняли ELISA связывание с пептидом AβpE3-42 (фиг. 6). Гуманизированные версии RHB, RHM, RHN, RHO и RHR в комбинации с RKA связывались с пептидом AβpE3-42, при этом RHB/RKA, RHM/RKA, RHN/RKA, RHO/RKA и RHR/RKA оказались наиболее оптимальными связывающими. Четыре из восьми ключевых остатков в каркасной области CDR тяжелой цепи в RHP (аргинин обратно мутировали при помощи SDM в валин), RHQ (валин обратно мутировали в фенилаланин), RHK (фенилаланин обратно мутировали в глицин) и RHL (лейцин обратно мутировали в изолейцин), показали пониженное связывание, что позволяет предположить, что эти четыре остатка следует сохранить в качестве мышинных остатков для обеспечения полного связывания. Создавали дополнительные гуманизированные варианты, включающие все четыре мышинных остатка, представленные как RHP, RHQ, RHK и RHL, и четыре ключевых остатка каркасной области, представленные как RHM, RHN, RHO и RHR, сохраняли в качестве человеческих каркасных остатков для создания версий RHS, RHT, RHU, RHV, RHW, RHX и RHY (таблица 2). ELISA связывание пептидов с AβpE3-42 показало, что варианты RHS-RHY в комбинации с RKA имеют профили связывания AβpE3-42 с RHB/RKA, аналогичные PSL (фиг. 8). Вариант RHS/RKA является предпочтительным с точки зрения количества содержащихся в нем «человеческих» ключевых остатков каркасной области CDR (более низкая иммуногенность).

Связывание антигена с гуманизированными антителами SA, S6A, S7A и S8A NT4X-167

Создавали дополнительные варианты RHS/KA (SA) для достижения >85% идентичности с человеческой зародышевой линией. Для версии SA выполняли анализ зазоров относительно доменов IMGT для выявления остатков, которые могут быть мутированы для увеличения процента идентичности с человеческой зародышевой линией. Легкая цепь RKA имела 89,6% идентичности последовательности с последовательностями человеческой зародышевой линии IGKV1-39*01 и IGKJ4*01. Однако тяжелая цепь RHS имела 79,4% идентичности последовательностью с последовательностями человеческой зародышевой линии IGHV4-4*08. Анализ последовательности RHS с зародышевой линией выявил шесть остатков, которые могут быть снова мутированы в направлении человеческой зародышевой линии, и получали версии RHS6, RHS7 и RHS8 в комбинации с RKA. ELISA связывание пептидов с AβpE3-42 показал, что вариант RHS7RKA (S7A) является оптимальным гуманизированным кандидатом и имеет 84,5% идентичности последовательности с человеческой зародышевой линией.

Связывание антигена дополнительными вариантами, созданными на основе кристаллической структуры антител NT4X-167

Дополнительные варианты RHS7 для увеличения % идентичности с человеческой зародышевой линией создавали на основе кристаллической структуры пептида pE3-14, связанного с мышинным NT4X FAB. Кристаллическая структура выявила F67, Y68 и I39 в качестве потенциальных аминокислот, которые можно изменить без оказания влияния на

связывание пептида. Таким образом, получали F67Y, Y68N, I39W и дополнительный вариант, в котором были объединены F67Y и Y68N (таблица 2), и изучали связывание с Aβ1-42, AβpE3-42 и 4-42. RHS71, который содержал мутацию F67Y, сохранил связывающие свойства, эквивалентные родительскому варианту тяжелой цепи S7A, и поэтому был выбран в качестве потенциального гуманизованного варианта тяжелой цепи в комбинации с легкой цепью RKA. Поскольку сродство этих антител находилось в диапазоне нМ, то основываясь на кристаллической структуре и используя программное обеспечение для предсказания путем моделирования на основе уравнения Шредингера решили оценить, можно ли предсказать, какие аминокислоты можно мутировать, с целью увеличения сродства антитела RHS71/RKA. Создавали пять дополнительных вариантов тяжелой цепи со следующими мутациями: S53M, S53H, R100H, L103R и L103H (таблица 4b). Кроме того, также создавали пять вариантов легкой цепи RKF (N92W), RKG (N92Y), RKH (N92H), RKI (L94R) и RKJ (L94H). Последовательности вариантов легкой цепи приведены в таблице 4. Связывание этих дополнительных гуманизованных вариантов с Aβ1-42, AβpE3-42 и 4-42 изучали с помощью ELISA (фиг.9) и Biacore. Среди всех протестированных вариантов RHS71 (который содержал мутацию F67Y в тяжелой цепи) в комбинации с RKH (который содержал мутацию N92H) показал двукратное улучшение по данным Biacore.

Термическая стабильность гуманизованных антител-кандидатов VA, SA, TA, UA, VA, WA, YA к высоким температурам

Целью этого эксперимента является проверка с помощью анализа ELISA термостабильности гуманизованных антител при воздействии более высоких температур, изменяющихся в течение 10 минут в диапазоне от 30° до 85°С, с последующим охлаждением до 4°С при концентрации EC₈₀ каждого кандидата. Все гуманизованные версии оказались стабильными и сохраняли связывающую способность с пептидом AβpE3-42 до 75°С, при более высоких температурах связывание с пептидом уменьшалось.

Определение T_m (температура плавления) гуманизованных антител-кандидатов NT4X-167-SA и NT4X-167-S7A

Для определения температуры плавления ведущих антител-кандидатов NT4X-167-SA и NT4X-167-S7A, антитела тестировали методом теплового сдвига. Образцы инкубировали с флуоресцентным красителем (Sypro Orange) в течение 71 цикла с увеличением на 1°С за цикл в термоциклере для количественной ПЦР. Расчетная T_m для гуманизованных антител составляла 66-67°С.

Агрегация гуманизованных антител-кандидатов NT4X-167-SA и NT4X-167-S7A

Образцы вводили со скоростью 0,4 мл/мин в эксклюзионную колонку в системе ВЭЖХ и анализировали с помощью многоуглового светорассеяния для определения абсолютных молярных масс и проверки агрегации (см. фиг. 10). Профиль не показал признаков агрегации со средней молекулярной массой примерно 133,98 кДа для NT4X-167_SA и 129,92 кДа для NT4X-167_S7A, что является ожидаемым диапазоном для мономера IgG в данной аналитической установке. Антитело является монодисперсным

($M_w/M_n < 1,05$). Выход продукта составил 100% (рассчитанная масса по сравнению с введенной массой), что указывает на хорошее извлечение белка и на то, что образец не прилипает к колонке и не содержит нерастворимых агрегатов, которые могут удерживаться предколонкой. В целом данные показывают отсутствие проблем с агрегацией у гуманизированных антител NT4X-167_SA и NT4X-167_S7A.

Неспецифические белок-белковые взаимодействия (СIC)

Хроматография для оценки перекрестного взаимодействия с использованием большого количества очищенного поликлонального человеческого IgG является методом мониторинга неспецифических белок-белковых взаимодействий, который можно использовать для различения растворимых и нерастворимых антител (раздел 8.19). Повышенный индекс удерживания (k') указывает на склонность к самовзадействию и низкую растворимость. Гуманизированные антитела RHS/RKA, RHB/RKA и RHS7/RKA NT4X-167 (клонированные как MoG1K) показали индекс удерживания менее 0,2, что указывает на низкую склонность к неспецифическим взаимодействиям и хорошую растворимость (фиг. 11).

Растворимость гуманизированных антител-кандидатов RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167

Гуманизированные антитела RHS/RKA (SA) и RHS7/RKA (S7A) NT4X-167 концентрировали с помощью концентраторов для абсорбции растворителя (MWCO 7500 кДа) и измеряли концентрацию через определенные интервалы времени. Антитело концентрировалось до >50 мг/мл без образования видимого осадка.

Анализ реакции гуманизированных антител-кандидатов RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167 на стресс, обусловленный замораживанием/оттаиванием

Образцы очищенных антител-кандидатов подвергали 10 циклам, состоящим из 15 минутного выдерживания при -80°C с последующим оттаиванием в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем образцы были анализировали с помощью SEC-MALS для проверки агрегации (фиг. 12 и 13). Данные свидетельствуют о том, что циклы замораживания/оттаивания не вызывают агрегацию гуманизированных антител NT4X-167.

Анализ гуманизированных антител-кандидатов RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167 на чувствительность к стрессу, индуцированному теплом

Образцы очищенных антител-кандидатов выдерживали при а) 4°C , б) 25°C , в) 37°C и д) 50°C в течение 30 дней. Затем образцы анализированы с помощью SEC-MALS для оценки агрегации (фиг. 14). В целом данные показывают на отсутствие проблем с агрегацией у гуманизированных антител NT4X-167.

Оценка стабильности сыворотки гуманизированных антител-кандидатов RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167

Очищенные образцы гуманизированных антител RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167 инкубировали в сыворотке мыши, человека и яванского макака. Связывающую способность антитела после инкубации измеряли с помощью ELISA путем связывания с пептидами AβpE3-42 и 4-42. Связывание гуманизированных антител NT4X-167, которые были

инкубированы в 3 различных сыворотках, сравнивали со связыванием антител, которые не были инкубированы, и антител, которые были инкубированы в PBS. Анализ ELISA показал, что связывание инкубированного в сыворотке антитела с пептидами AβpE3-42 и 4-42 очень похоже на связывание антитела, инкубированного с PBS, и неинкубированного антитела. Следовательно, гуманизированные антитела RHS/RKA и RHS7/RKA NT4X-167 сохраняют свою связывающую способность после инкубирования в сыворотке мыши, человека и яванского макака в течение 30 дней.

Было показано, что гуманизированное NT4X-167 способно связываться с амилоидными пептидами 4-42, AβpE3-42, но не связывается с Aβ1-42. Гуманизированное антитело также обеспечивало защиту нейронов от гибели у крыс и человека. Создавали антитело, которое экспрессировали как полностью гуманизированное антитело без значительной потери связывающей способности. Эксперименты с химерными антителами, состоящими из мышинных вариабельных областей на человеческих константных областях, показали аналогичную или улучшенную эффективность связывания в методе ELISA или в кинетических исследованиях с помощью Biacore по сравнению с мышинным антителом (фиг. 1 и 2).

Первоначальные эксперименты показали, что полностью гуманизированное NT4X-167, т.е. без мутаций в каркасной области, для введения мышинных остатков в пределах 4Å, не связывалось с пептидом AβpE3-42, также как химерное антитело положительного контроля, но версии с полным набором мутаций связывались наравне с химерным положительным контролем. Такое уменьшение связывания наблюдали для полностью гуманизированной тяжелой цепи. Однако неожиданно было обнаружено, что введение специфических обратных мутаций позволило создать два основных антитела-кандидата, RHS/RKA (SA) и NT4X RHS7/RKA (S7A) NT4X. Эти ведущие кандидаты также клонировали в векторы HuG1K и HuG4K, и в исходные векторы MoG1. Оба кандидата продемонстрировали отличное связывание, экспрессию, термостабильность, сродство и функциональную активность.

Клеточные анализы *in vitro*

Защита нейронов с помощью гуманизированных антител NT4X_SA и NT4X_S7A в культурах первичных корковых нейронов крыс и человека

Было обнаружено, что гуманизированные антитела NT4X_SA и NT4X_S7A сохраняют свойства исходного мышинового антитела NT4X в отношении защиты от индуцированной N-укороченными амилоидными пептидами (4-42 и ругоGul3-42; фиг.17 и 18) гибели клеток в нейронах крыс, но не в случае амилоидного полноразмерного пептида Aβ1-42 (фиг. 19). Все 3 антитела оказались достаточно эффективными в отношении пептида 4-42, но мышинный NT4X был немного более эффективным в отношении руго3-42, чем SA или S7A, при этом S7A был немного более эффективным, чем SA.

Было обнаружено, что в нейронах человека гуманизированные антитела NT4X_SA и NT4X_S7A сохраняют свойства исходного мышинового антитела NT4X в отношении защиты от индуцированной N-укороченными амилоидными пептидами (4-42 и ругоGul3-

42; Фиг.20 и 21) гибели клеток, но не в случае полноразмерного амилоидного пептида A β 1-42 (фиг. 22). Все 3 гуманизированных антитела были более эффективными, чем исходное мышинное антитело NT4X в отношении защиты клеток от индуцированной пептидом 4-42 гибели, однако гуманизированное антитело N92H было более эффективным в отношении рогоGul3-42. Ни одно из антител NT4X или гуманизированная версия не защищала человеческие нейроны от гибели, индуцированной амилоидным пептидом A β 1-42. Результаты в значительной степени согласуются с результатами, полученными для нейронов крыс, при этом в нейронах человека эффективность в отношении рого3-42с была несколько выше.

Тестирование *in vivo* на моделях трансгенных мышей

Лечение болезни Альцгеймера с помощью гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A на мышинных моделях 5XFAD и Tg4-42

Мышей Tg4-42, экспрессирующих A β 4-42, иммунизировали, начиная с 12-недельного возраста, в течение 12 недель. Было продемонстрировано, что гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A восстанавливают потерю нейронов CA1 в гиппокампе Tg4-42 с более высоким терапевтическим эффектом, наблюдаемым для гсNT4X_S7A. Эффективность гсNT4X_S7A дополнительно оценивали в тесте водного лабиринта Морриса для оценки пространственной долговременной памяти. Дефицит пространственной долговременной памяти у мышей Tg4-42 в возрасте шести месяцев был полностью устранен.

Мышей 5XFAD иммунизировали, начиная с шестинедельного возраста, в течение 12 недель. Влияние на нагрузку бляшками анализировали в коре головного мозга. SA гсNT4X уменьшало количество бляшек, окрашенных тиофлавином, и N-концевыми антителами, специфическими к пироглутамат-A β 3-X и A β 4-X. Никакого эффекта не наблюдали в случае антител к пан-A β и A β 1-X в отличие от мышей, иммунизированных гсNT4X_S7A, которые продемонстрировали значительное уменьшение бляшек во всех анализах окрашивания: количество бляшек, окрашенных тиофлавином или антителами, распознающими A β 1-X, пироглутамат-A β 3-X, A β 4-X и пан-A β , значительно уменьшилось.

гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A спасают от потери нейронов и снижения памяти у мышей Tg4-42

Потеря нейронов CA1 в гиппокампе мышей Tg4-42 значительна в возрасте четырех месяцев [6]. Поэтому лечение начинали путем пассивной иммунизации через три месяца в течение 12 недель. У мышей Tg4-42, иммунизированных гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A, было обнаружено значительно большее количество нейронов по сравнению с контрольной группой IgG1. Уровень значимости был выше в группе гсNT4X_S7A (фиг. 23). Иммунизация Tg4-42 антителом гсNT4X_S7A была значительно более эффективной по сравнению с NT4X (фиг. 24). Разница в количестве нейронов между исходным NT4X и гсNT4X_SA отсутствовала. Данные по иммунизации гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A наносили на график для сравнения с данными по иммунизации исходным мышинным антителом NT4X. Контрольные группы, которым вводили IgG1, IgG2b и PBS, не показали существенных различий (фиг. 25). Данные для IgG2ba и PBS брали у Antonios et al. [6].

Пассивная иммунизация гсNT4X_S7A полностью устраняла дефицит пространственной долговременной памяти у мышей Tg4-42, испытанных в водном лабиринте Морриса (фиг. 26).

гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A снижают нагрузку бляшками у мышей 5XFAD

Мыши 5XFAD получали лечение в возрасте от шести до 18 недель. Пассивная иммунизация обоими антителами гсNT4X снижала нагрузку бляшками, обусловленную различными видами Аβ, по сравнению с антителом IgG1 изотипического контроля. гсNT4X значительно уменьшало количество бляшек, окрашенных на пироглутамат-Аβ3-х, Аβ4-х и тиофлавином. В Аβ1-х и пан-Аβ-положительных бляшках не наблюдали никакого эффекта. Эффективность гсNT4X_S7A в отношении уменьшения образования бляшек значительно отличалась, поскольку уменьшилось количество бляшек, не только положительных по пироглутамат-Аβ3-х, Аβ4-х и тиофлавинолу, но также и количество бляшек, положительных по Аβ1-х и пан-Аβ (фиг. 27).

У мышей Tg4-42 развивается тяжелая потеря нейронов гиппокампа и дефицит пространственной долговременной памяти [2,6]. Модель Tg4-42 представляет собой первую мышиную модель, экспрессирующую исключительно N-укороченный Аβ4-42. В возрасте шести месяцев в этой модели у мышей Tg4-42 наблюдается значительная потеря пространственной долговременной памяти, которую можно оценить с помощью теста водного лабиринта Морриса, а в гиппокампе образуются массивные дегенерированные нейроны CA1; при этом пассивная иммунизация антителом NT4X позволяет это предотвратить [6]. В настоящем исследовании была использована новая гуманизованная версия антитела NT4X, клонированного на основе мышиногo IgG1. Пассивная иммунизация гсNT4X_S7A, начиная с трехмесячного возраста, в течение 12 недель, также устраняла дефицит пространственной долговременной памяти у мышей Tg4-42. Более того, количество нейронов CA1 в гиппокампе было значительно уменьшено по сравнению с группой животных Tg4-42, обработанных IgG1. Следует отметить, что при сравнении лечебного эффекта между NT4X, гсNT4X_SA и гсNT4X_S7A, мыши Tg4-42, получавшие гсNT4X_S7A, выглядели значительно более здоровыми по сравнению с NT4X. Этот факт наводит на предположение, что гсNT4X_S7A является наиболее эффективным среди различных версий NT4X.

Последовательности

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYGHWIRQP PGKGLEWIGV
MWSGGITDFY AAFISRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGSR
YALDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 1, последовательность RHA

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSL S SYGHWIRQP PGKGLEWIGV
MWSGGITX₁X₆Y X₂X₃X₄X₅SRVTIS RDTSKNQVSL KLSSVTAADT AVYYCARGSR
YALDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 2, последовательность RHA с 27F, 29L, 63R и 70V и 52BX₁, 53X₂, 54X₃, 55X₄, 56X₅ и 52CX₆, где X₁ представляет собой D или N, X₂ представляет собой A, N или P,

X_3 представляет собой A или S, X_4 представляет собой F или L, X_5 представляет собой I или K, и X_6 представляет собой F или Y.

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSL S YGIHWIRQP PGKGLEWIGV
MWSGGITDFY AAFISRVTIS RDTSKNQVSL KLSSVTAADT AVYYCARGSR
YALDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 3, последовательность RHS

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSL S YGIHWIRQP PGKGLEWIGV
MWSGGITNFY PSLKSRVTIS RDTSKNQVSL KLSSVTAADT AVYYCARGSR
YALDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 4, последовательность RHS7

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSL S YGIHWIRQP PGKGLEWIGV
MWSGGITNYY PSLKSRVTIS RDTSKNQVSL KLSSVTAADT AVYYCARGSR
YALDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 5, последовательность RHS71

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GX₇ TLPPTFGG GTKLEIK

SEQ ID NO: 6, последовательность RKA с 92 X_7 , где X_7 представляет собой N, H, Y или W

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

SEQ ID NO: 7, последовательность RKA

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GHTLPPTFGG GTKLEIK

SEQ ID NO: 8, последовательность RKH

5' GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCA
 120
 0
 1 D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P
 0

5' GATGGAAGCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAA
 240
 0
 1 D G T V K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q
 0

5' GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGTAATACGCTTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGAAAATCAAA
 0
 1 E D I A T Y F C Q Q G N T L P P T F G G G T K L E I K
 0

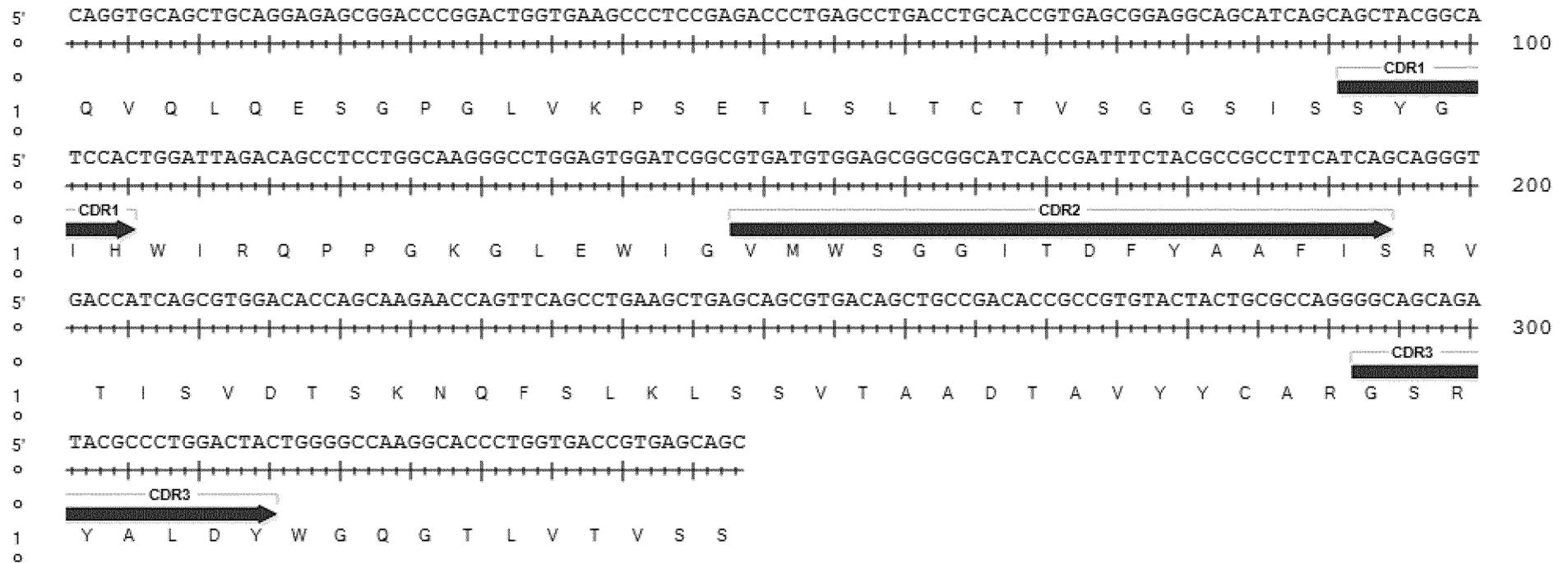
SEQ ID NO: 9 и 10, последовательности белка и ДНК переменной области легкой цепи kappa NT4X-167

5' CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAAGTAGCTATGGTATACACTGGGTTCGCCAGTCT
 120
 0
 1 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S L T S Y G I H W V R Q S
 0

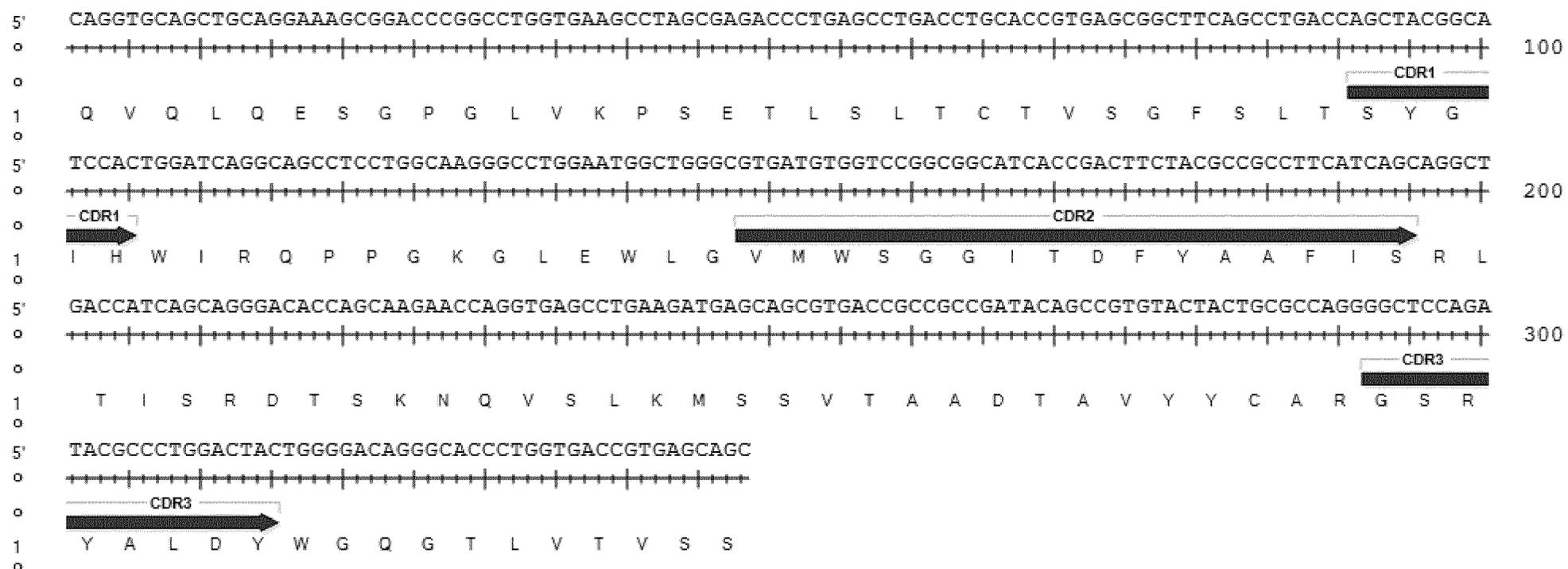
5' CCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATGTGGAGTGGTGGAAATCACAGACTTTTATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAGGGACATCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTT
 240
 0
 1 P G K G L E W L G V M W S G G I T D F Y A A F I S R L S I S R D I S K S Q V F F
 0

5' AAAATGAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGAGTCGCTATGCTTGGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCTCCGTCTCCTCA
 0
 1 K M N S L Q A D D T A I Y Y C A R G S R Y A L D Y W G Q G T S V S V S S
 0

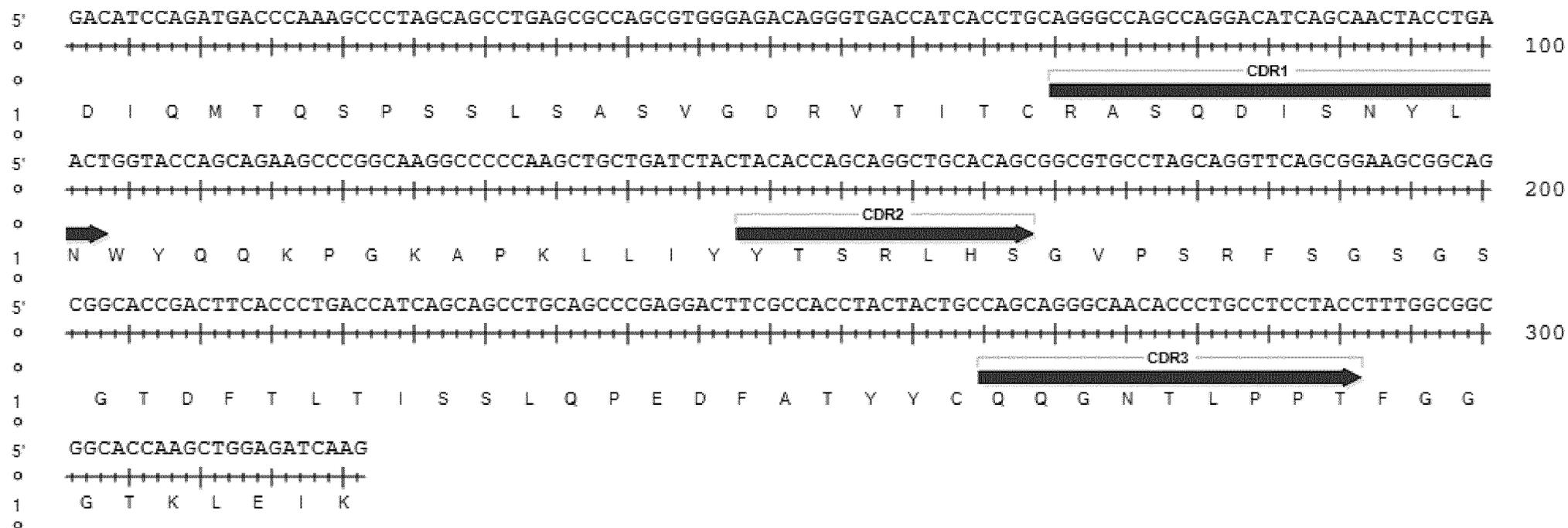
SEQ ID NO: 11 и 12: последовательности белка и ДНК переменной области тяжелой цепи NT4X-167



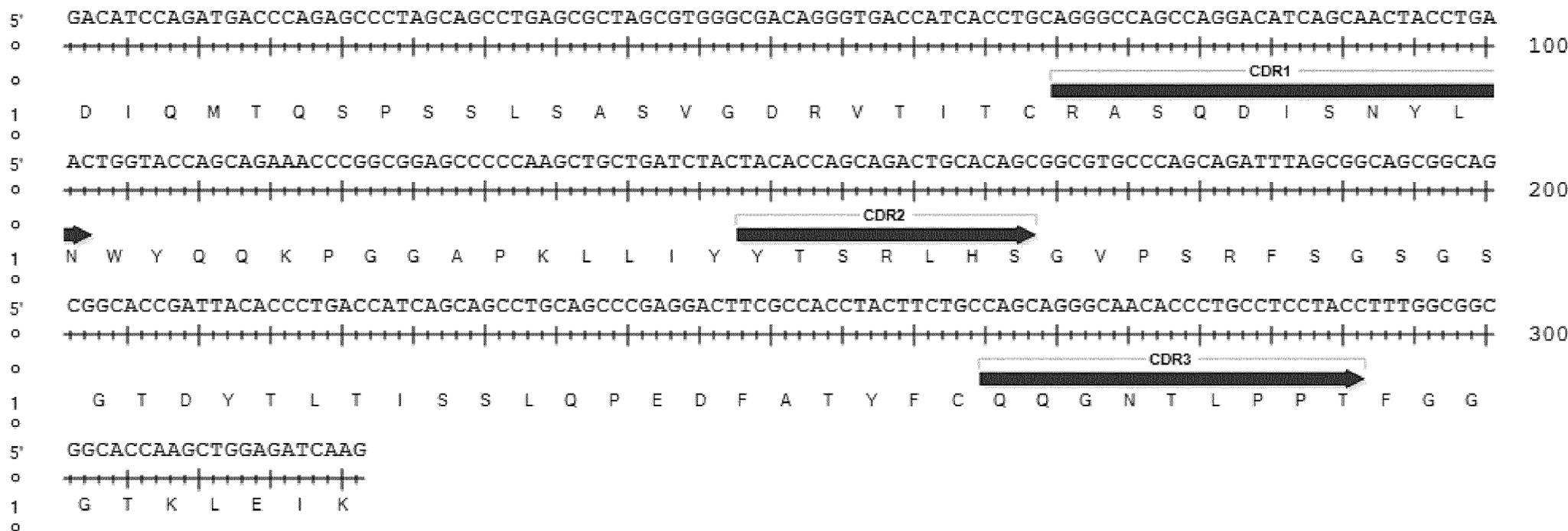
SEQ ID NO: 13 и 14: последовательности белка и ДНК НА NT4X-167



SEQ ID NO: 15 и 16: последовательности белка и ДНК НВ NT4X-167



SEQ ID NO: 17 и 18: последовательности белка и ДНК КА NT4X-167



SEQ ID NO: 19 и 20: последовательности белка и ДНК KB NT4X-167

RHM	VTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSV
RHN	TAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWL_GVMWSSGGITDFYAAFISRVTISRDTSKNQVSLKMSS
RHO	VTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWL_GVMWSSGGITDFYAAFISRLTISVDTSKNQVSLKMSS
RHP	VTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWL_GVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQFSLKMSSV
RHQ	TAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWL_GVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKLSSV
RHR	TAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGIHWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITDFYAAFISRVTISRDTSKNQVSLKLSSV
RHS	TAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITDFYAAFISRVTISRDTSKNQVSLKLSSV
RHT	TAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS

CDR заключены в прямоугольники

Подчеркнутые остатки указывают возврат к мышинному остатку

Остатки, указанные жирным шрифтом, означают критические остатки FW, сохраненные как в человеческой последовательности, для увеличения % идентичности с человеческой последовательностью

В таблице 1 приведено выравнивание последовательностей NT4X_VH (SEQ ID NO: 12), AF062228 (SEQ ID NO: 21), NT4X RHA (SEQ ID NO: 22), NT4X RHB (SEQ ID NO: 23), NT4X RHC (SEQ ID NO: 24), NT4X RHD (SEQ ID NO: 25), NT4X RHE (SEQ ID NO: 26), NT4X RHF (SEQ ID NO: 27), NT4X RHG (SEQ ID NO: 28), NT4X RHH (SEQ ID NO: 29), NT4X RHI (SEQ ID NO: 30), NT4X RHJ (SEQ ID NO: 31), NT4X RHK (SEQ ID NO: 32), NT4X RHL (SEQ ID NO: 33), NT4X RHM (SEQ ID NO: 34), NT4X RHN (SEQ ID NO: 35), NT4X RHO (SEQ ID NO: 36), NT4X RHP (SEQ ID NO: 37), NT4X RHQ (SEQ ID NO: 38), NT4X RHR (SEQ ID NO: 39), NT4X RHS (SEQ ID NO: 40), and NT4X RHT (SEQ ID NO: 41).

Таблица 1

Стратегия гуманизации тяжелой цепи NT4X-167

NT4X*RHS74(I39W)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG W HWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITN F YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLLTVSS
NT4X*RHS81(S53M)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG I HWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITN Y YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLLTVSS
NT4X*RHS82(S53H)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG I HWIRQPPGKGLEWIGVMW H GGITN Y YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLLTVSS
NT4X*RHS83(R100H)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG I HWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITN Y YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLLTVSS
NT4X*RHS84(L103R)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG I HWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITN Y YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA----- R DYWGQGTLLTVSS
NT4X*RHS85(L103H)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYG I HWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITN Y YPSL K SRVTISRDTSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCARGSRYA----- H DYWGQGTLLTVSS

CDR заключены в прямоугольники

Остатки, обозначенные черным, указывают возврат к мышинному остатку

Остатки, обозначенные **черным**, обозначают критические остатки FW, сохраненные как в человеческой последовательности

Остатки, обозначенные черным, обозначают остатки CDR по KABAT, мутированные для выбора остатков человеческой FW (с учетом CDR IMGT)

Остатки, обозначенные черным, обозначают дополнительные мутации для увеличения % идентичности с человеческой последовательностью

Остатки, обозначенные черным, обозначают мутации созревания сродства

В таблице 2 приведено выравнивание последовательностей NT4X_VH (SEQ ID NO: 12), AF062228 (SEQ ID NO: 21), NT4X RHA (SEQ ID NO: 22), NT4X RHB (SEQ ID NO: 23), NT4X RHS (SEQ ID NO: 40), NT4X RHS2 (SEQ ID NO: 42), NT4X RHS3 (SEQ ID NO: 43), NT4X RHS4 (SEQ ID NO: 44), NT4X RHS5 (SEQ ID NO: 45), NT4X*RHS6 (SEQ ID NO: 46), NT4X*RHS7 (SEQ ID NO: 47), NT4X*RHS8 (SEQ ID NO: 48), NT4X*RHS71(F67Y) (SEQ ID NO: 49), NT4X*RHS72(Y68N) (SEQ ID NO: 50), NT4X*RHS73(F67Y/Y68N) (SEQ ID NO: 51), NT4X*RHS74(I39W) (SEQ ID NO: 52), NT4X*RHS81(S53M) (SEQ ID NO: 53), NT4X*RHS82(S53H) (SEQ ID NO: 54), NT4X*RHS83(R100H) (SEQ ID NO: 55), NT4X*RHS84(L103R) (SEQ ID NO: 56) и NT4X*RHS85(L103H) (SEQ ID NO: 57).

Таблица 2

Стратегия гуманизации тяжелой цепи NT4X-167 - дополнительные версии тяжелой цепи с увеличенным % идентичности с человеческой последовательностью и увеличенным сродством

Последовательность NT4X (VH)	Mo (остатки)	Измененные на hu остатки	Замены AA	Общий % HuID (J область не включена)
RHS				79,4
RHS6	H40	S40	1	80,4
RHS7	D66&AAFI (69-72)	N66 & PSLK (69-72)	5	84,5
RHS8	H40; D66&AAFI (69-72)	S40; N66 & PSLK (69-72)	6	85,6
RHS71	F67	F67Y	1	85,6
RHS72	Y68	Y68N	1	85,6
RHS73	F67 & Y68	F67Y & Y68N	2	86,6
RHS74	I39	I39W	1	85,6

Таблица 3

Гуманизация тяжелой цепи NT4X-167: % идентичности с человеческой последовательностью версий RHS

(SEQ ID NO: 59), NT4X RKB (SEQ ID NO: 60), NT4X RKC (SEQ ID NO: 61), NT4X RKD (SEQ ID NO: 62), NT4X RKE (SEQ ID NO: 63), NT4X RKF (N92W) (SEQ ID NO: 64), NT4X RKG (N92Y) (SEQ ID NO: 65), NT4X RKH (N92H) (SEQ ID NO: 66), NT4X RKI (L94R) (SEQ ID NO: 67) и NT4X RKJ (L94H) (SEQ ID NO: 68).

Таблица 4

Стратегия гуманизации легкой цепи капа NT4X-167

	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (M)
$A\beta_{pE3-42}$	$5,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-7}$
$A\beta_{4-42}$	$9,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-7}$

Таблица 5

NT4X_VH	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTSYGIHWVRQSPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLSISRDISKSQVFFKMNSLQ ADDTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
AF062228	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARGSNYDFWSGYSNFDYWGQGLVTVSS
NT4X_RHA	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGIHWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITDFYAAFISRVTVISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHB	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHK	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSITSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHM	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHN	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWIGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHO	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRVTVISRDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHP	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISVDTSKNQVSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHQ	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQFSLKMSSVT AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS
NT4X_RHR	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGIHWIRQPPGKGLEWLGVMWSSGGITDFYAAFISRLTISRDTSKNQVSLKLSST AADTAVYYCARGSRYA-----LDYWGQGTLVTVSS

Таблица 6 Аминокислотные последовательности тяжелой цепи (см. фиг. 7)

В таблице 6 показаны последовательности NT4X_VH (SEQ ID NO: 12), AF062228 (SEQ ID NO: 21), NT4X_RHA (SEQ ID NO: 22), NT4X_RHB (SEQ ID NO: 23), NT4X_RHK (SEQ ID NO: 32), NT4X_RHL (SEQ ID NO: 33), NT4X_RHM (SEQ ID NO: 34), NT4X_RHN (SEQ ID NO: 35), NT4X_RHO (SEQ ID NO: 36), NT4X_RHP (SEQ ID NO: 37), NT4X_RHQ (SEQ ID NO: 38) и NT4X_RHR (SEQ ID NO: 39)

Литература:

1. Oakley, H., et al., J Neurosci 2006, 26, 10129-10140
2. Bouter, Y. et al., Acta Neuropathol 2013, 126, 189-205
3. Morris, R. J., Neurosci Methods 1984, 11, 47-60.
4. Jawhar, S. et al., Neurobiol Aging 2012, 33, 196.e129-196.e140.
5. Wirths, O. et al., J Neural Transm 2010, 117, 85-96
6. Antonios, G., et al., Scientific reports 2015, 5, 17338. doi:10.1038/srep17338
7. Wittnam, J.L. et al., J Biol Chem 2012, 287, 8154-8162
8. Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5 ed. NIH National Technical Information Service. (1991) 1-3242.
9. Lefranc, M.-P., et al., Nucl. Acids Res. (2015) 43 (D1): D413-D422. doi: 10.1093/nar/gku1056

Дополнительные аспекты изобретения:

Следующие пронумерованные положения изобретения являются частью описания:

1. Антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, где
 - a) переменный домен тяжелой цепи (домен VH) содержит SEQ ID NO: 2 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях, и
 - b) переменный домен легкой цепи (домен VK) содержит SEQ ID NO: 6 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.
2. Антитело по п. 1, которое связывается с амилоидными пептидами A β Е3-42 и A β 4-42 и не связывается с амилоидным пептидом A β 1-42.
3. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое связывается с амилоидным пептидом A β Е3-42 со сродством связывания, составляющим по меньшей мере 85% от сродства связывания мышинового антитела NT4X-167 с амилоидным пептидом A β Е3-42, измеренное с помощью ELISA.
4. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором домен VH содержит SEQ ID NO: 2.
5. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором домен VL содержит SEQ ID NO: 6.
6. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X1 (положение 52В по Кабат) представляет собой D.
7. Антитело по любому из пп.1-5, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X1 (положение 52В по Кабат) представляет собой N.
8. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X2 (положение 53 по Кабат) представляет собой A.
9. Антитело по любому из пп.1-7, в котором переменный домен тяжелой цепи

содержит SEQ ID NO: 2, где X2 (положение 53 по Кабат) представляет собой P.

10. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X3 (положение 54 по Кабат) представляет собой A.

11. Антитело по любому из пп.1-9, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X3 (положение 54 по Кабат) представляет собой S.

12. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X4 (положение 55 по Кабат) представляет собой F.

13. Антитело по любому из пп.1-11, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X4 (положение 55 по Кабат) представляет собой L.

14. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X5 (положение 56 по Кабат) представляет собой I.

15. Антитело по любому из пп.1-13, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X5 (положение 56 по Кабат) представляет собой K.

16. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X6 (положение 52C по Кабат) представляет собой F.

17. Антитело по любому из пп.1-15, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 2, где X6 (положение 52C по Кабат) представляет собой Y.

18. Антитело по любому из пп.1-5, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 3 с четырьмя или менее дополнительными заменами в каркасных областях.

19. Антитело по п.18, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 3.

20. Антитело по любому из пп.1-5, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 4 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.

21. Антитело по п.20, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 4.

22. Антитело по любому из пп.1-5, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 5 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.

23. Антитело по п.22, в котором переменный домен тяжелой цепи (VH) содержит SEQ ID NO: 5.

24. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 6, где X7 (положение 92 по Кабат) представляет собой N.

25. Антитело по любому из пп.1-23, в котором переменный домен легкой цепи

содержит SEQ ID NO: 6, где X7 (положение 92 по Кабат) представляет собой H.

26. Антитело по любому из пп.1-23, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 6, где X7 (положение 92 по Кабат) представляет собой Y.

27. Антитело по любому из пп.1-23, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 6, где X7 (положение 92 по Кабат) представляет собой W.

28. Антитело по любому из пп.1-25, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 7 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.

29. Антитело по п.28, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 7.

30. Антитело по любому из пп.1-23 и п.25, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 8 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях.

31. Антитело по п.30, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 8.

32. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее домен VH из SEQ ID NO: 3 и домен VK из SEQ ID NO: 7.

33. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее домен VH из SEQ ID NO: 4 и домен VK из SEQ ID NO: 7.

34. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее домен VH из SEQ ID NO: 5 и домен VK из SEQ ID NO: 8.

35. Антитело по любому из пп.1-5, содержащее домен VH из SEQ ID NO: 5 и домен VK из SEQ ID NO: 7.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих пунктов с фармацевтически приемлемым носителем.

37. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-35.

38. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.37, функционально связанную с промотором.

39. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.37 или вектор по п.38.

40. Способ получения антитела по любому из пп.1-35, включающий экспрессию вектора по п.36 в культуре клеток-хозяев для получения указанного антитела; и выделение антитела из культуры клеток.

41. Способ лечения или профилактики болезни Альцгеймера путем введения нуждающемуся в лечении пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-35 или фармацевтической композиции по п.36.

42. Антитело по любому из пп.1-35 или фармацевтическая композиция по п.36 для использования в способе лечения организма человека или животного.

43. Антитело по любому из пп.1-35 или фармацевтическая композиция по п.36 для использования в способе лечения болезни Альцгеймера у индивидуума.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, где

а) переменный домен тяжелой цепи (домен VH) содержит SEQ ID NO: 2 с четырьмя или менее дополнительными изменениями в каркасных областях, и

б) переменный домен легкой цепи (домен VK) содержит SEQ ID NO: 6 с четырьмя или менее дополнительными изменениями в каркасных областях.

2. Антитело по п. 1, которое связывается с амилоидными пептидами A β Е3-42 и A β 4-42 и не связывается с амилоидным пептидом A β 1-42.

3. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором домен VH содержит SEQ ID NO: 2, и домен VL содержит SEQ ID NO: 6.

4. Антитело по любому из пп.1-3, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 3 с четырьмя или менее дополнительными изменениями в каркасных областях, причем домен тяжелой цепи необязательно содержит SEQ ID NO: 3.

5. Антитело по любому из пп.1-3, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 4 с четырьмя или менее дополнительными изменениями в каркасных областях, причем переменный домен тяжелой цепи необязательно содержит SEQ ID NO: 4.

6. Антитело по любому из пп.1-3, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 5 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях, причем переменный домен тяжелой цепи необязательно содержит SEQ ID NO: 5.

7. Антитело по любому из пп.1-6, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 7 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях, причем переменный домен легкой цепи необязательно содержит SEQ ID NO: 7.

8. Антитело по любому из пп.1-6, в котором переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 8 с четырьмя или менее дополнительными изменениями, такими как замены, в каркасных областях, причем переменный домен легкой цепи необязательно содержит SEQ ID NO: 8.

9. Антитело по любому из пп.1-3, содержащее домен VH SEQ ID NO: 3 и домен VK SEQ ID NO: 7.

10. Антитело по любому из пп.1-3, содержащее домен VH SEQ ID NO: 4 и домен VK SEQ ID NO: 7.

11. Антитело по любому из пп.1-3, содержащее домен VH SEQ ID NO: 5 и домен VK SEQ ID NO: 8.

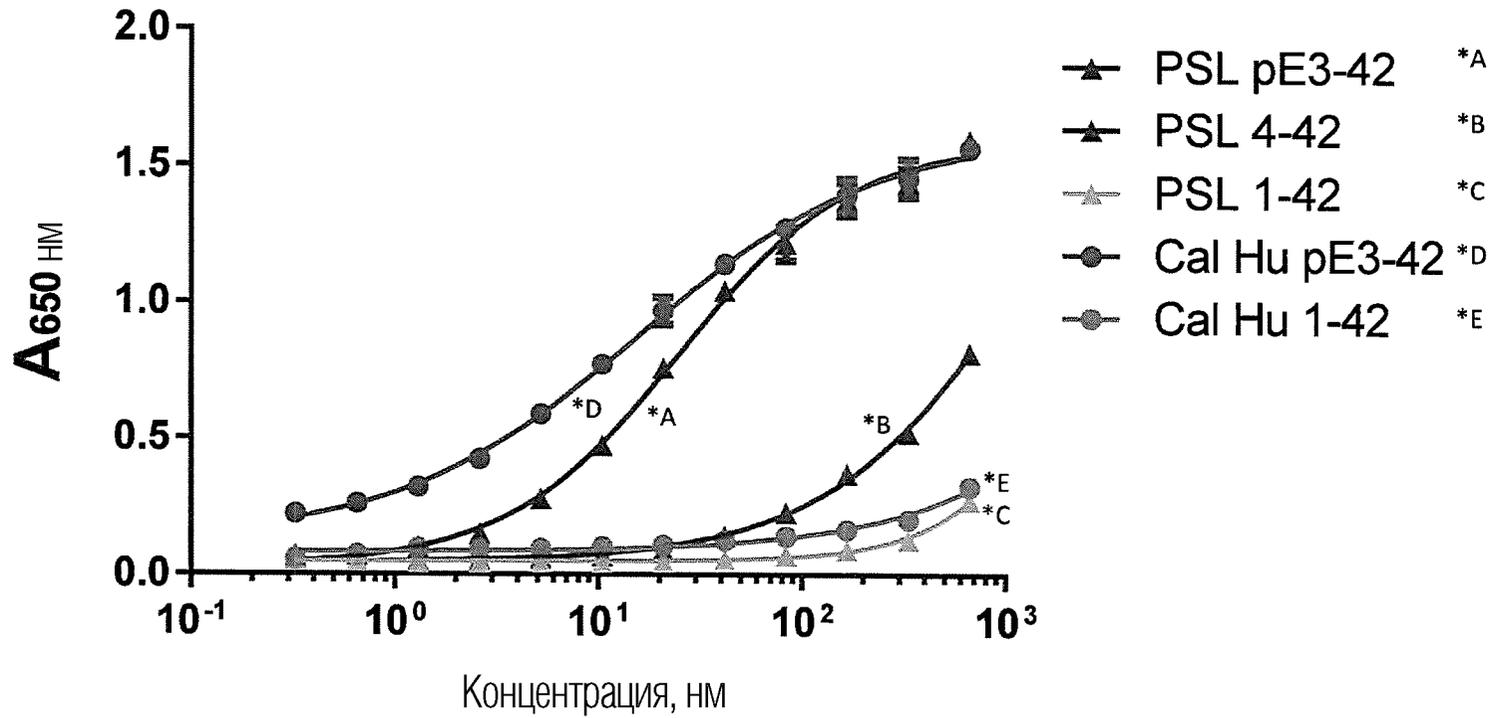
12. Антитело по любому из пп.1-3, содержащее домен VH SEQ ID NO: 5 и домен VK SEQ ID NO: 7.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих пунктов с фармацевтически приемлемым носителем.

14. Антитело по любому из пп.1-12 или фармацевтическая композиция по п.14 для применения в способе лечения организма человека или животного.

15. Антитело по любому из пп.1-12 или фармацевтическая композиция по п.14 для применения в способе лечения болезни Альцгеймера у индивидуума.

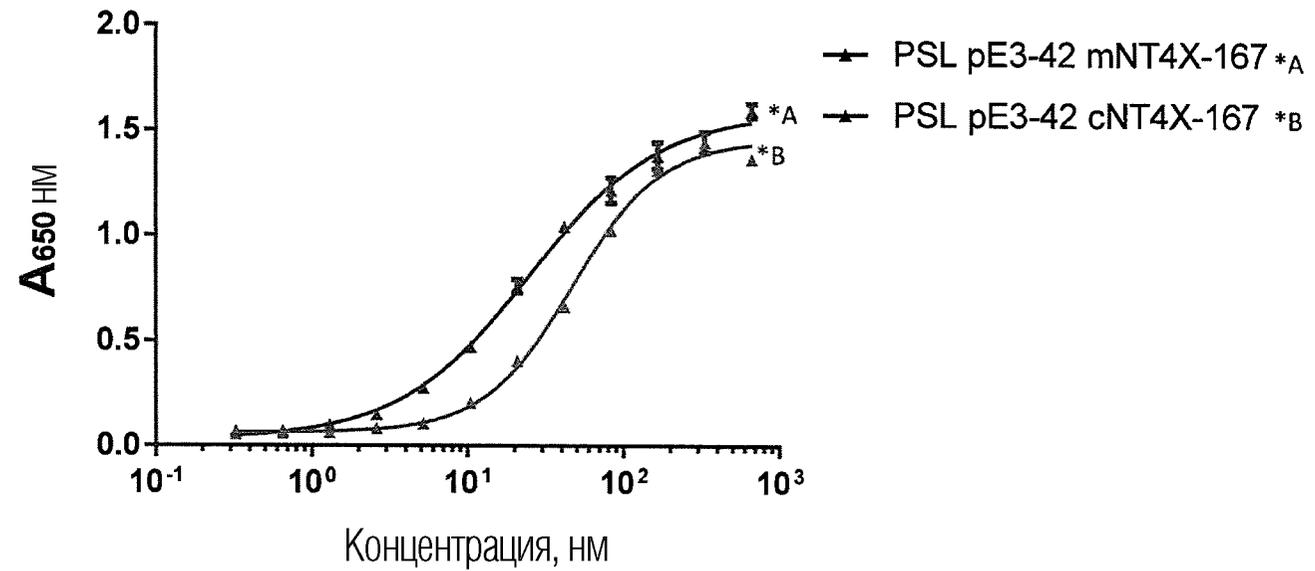
ФИГ. 1



	PSL AβpE3-42	Cal Hu AβpE3-42
EC50nm	24.92	15.67

ФИГ. 2

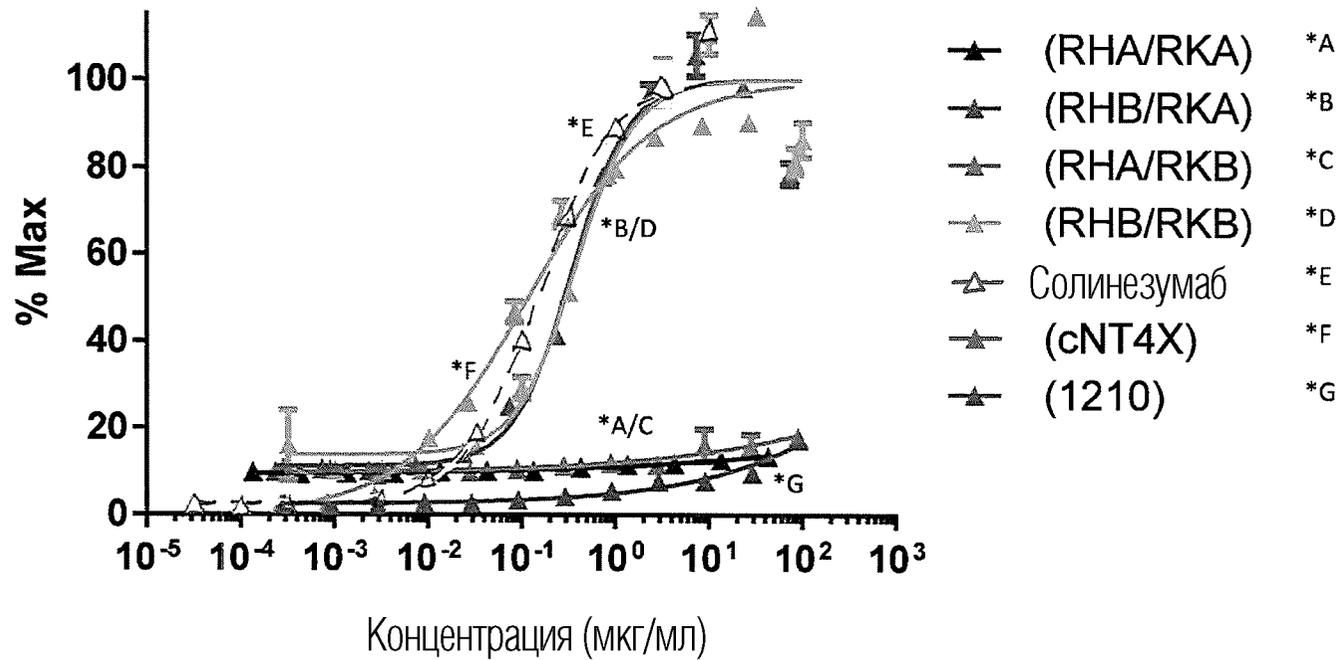
ELISA связывание для мышинных и химерных NT4X (пептиды PSL)



	PSL AβpE3-42 mNT4X (*A)	PSL AβpE3-42 chimeric NT4X (*B)
Ec50nm	24.92	47.08

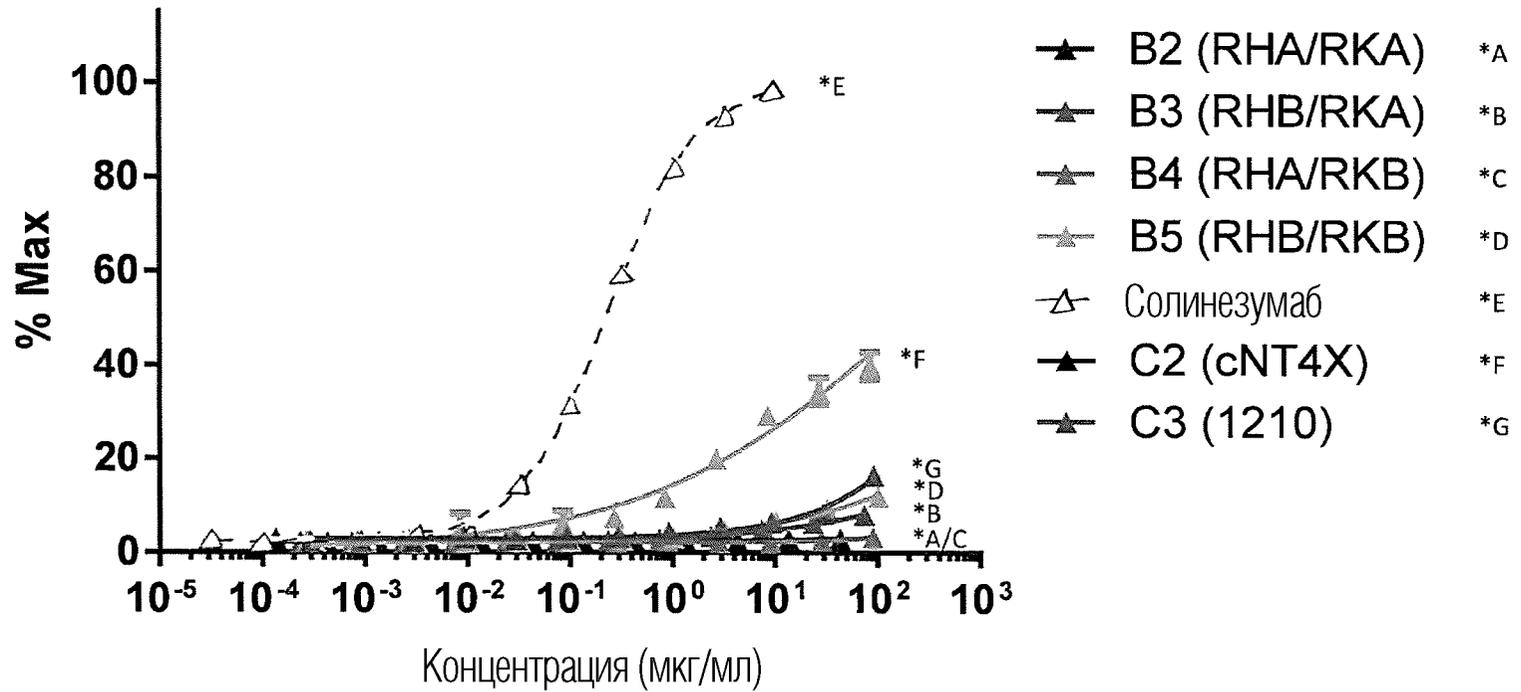
ФИГ. 3

Связывание гуманизированных вариантов с рЕ3-42



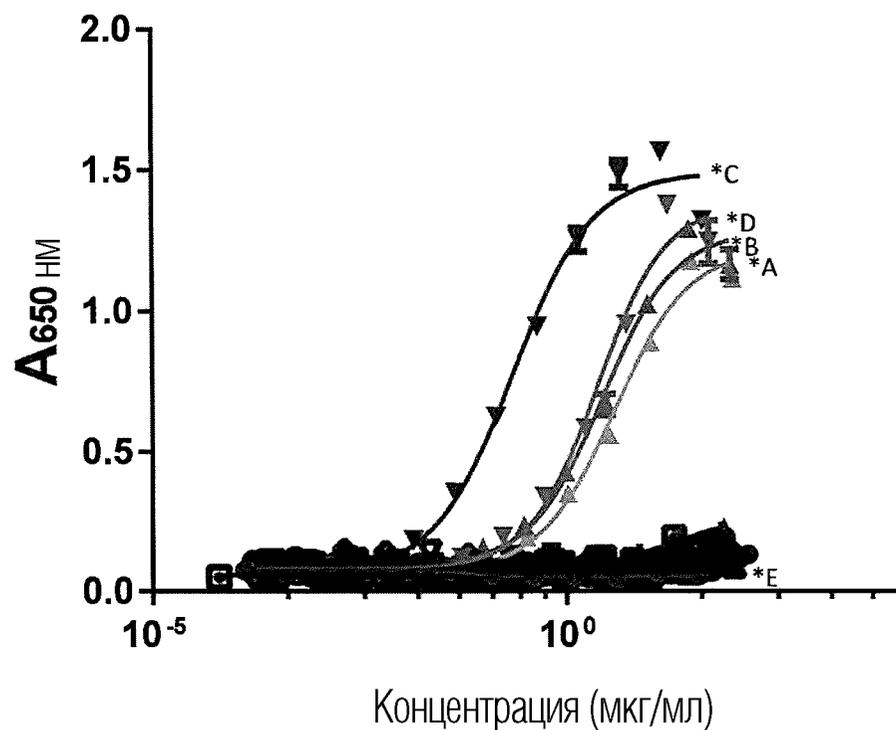
	RHA/RKA *A	RHA/RKB *C	RHB/RKA *B	RHB/RKB *D	сNT4X *F	СОЛИНЕЗУМАБ *E
Ес50 (мкг/мл)	Связывания нет	Связывания нет	0.341	0.3766	0.118	0.15

ФИГ. 4



	RHA/RKA	RHA/RKB	RHB/RKA	RHB/RHB	сNT4X	СОЛИНЕЗУМАБ
Ес50 (мкг/мл)	Связывания нет	Связывания нет	Связывания нет	Связывания нет	213.7	0.22

ФИГ. 5

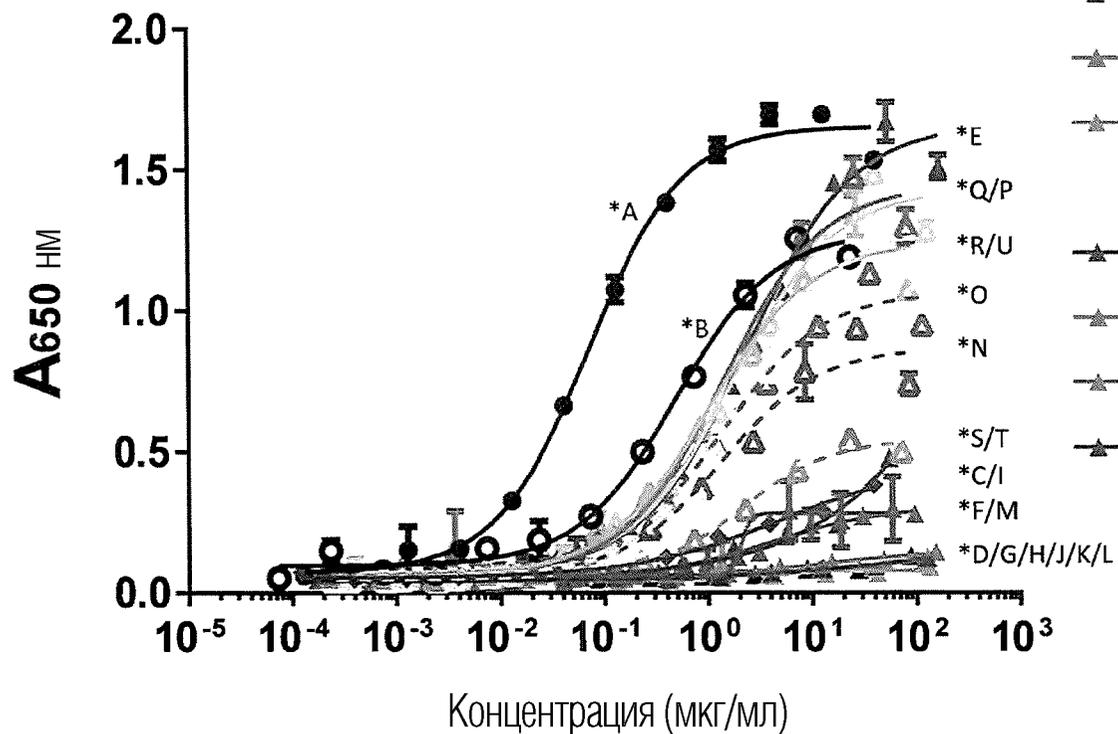


- NT4X001 (AA)
- ▲ NT4X002 (BA)*^A
- ▲ NT4X003 (CA)
- NT4X004 (DA)
- ◆ NT4X005 (EA)
- NT4X006 (FA)
- NT4X007 (GA)
- ▲ NT4X008 (HA)
- ▽ NT4X009 (IA)
- ◆ NT4X010 (JA)
- NT4X011 (AB)
- ▲ NT4X012 (BB)*^B
- ◆ NT4X013 (CB)
- ✱ NT4X014 (DB)
- NT4X015 (EB)
- NT4X016 (FB)
- NT4X017 (GB)
- NT4X018 (HB)
- NT4X019 (IB)
- NT4X020 (JB)
- ▽ cNT4X *^C
- ▽ mNT4X *^D
- 1210 *^E

5/31

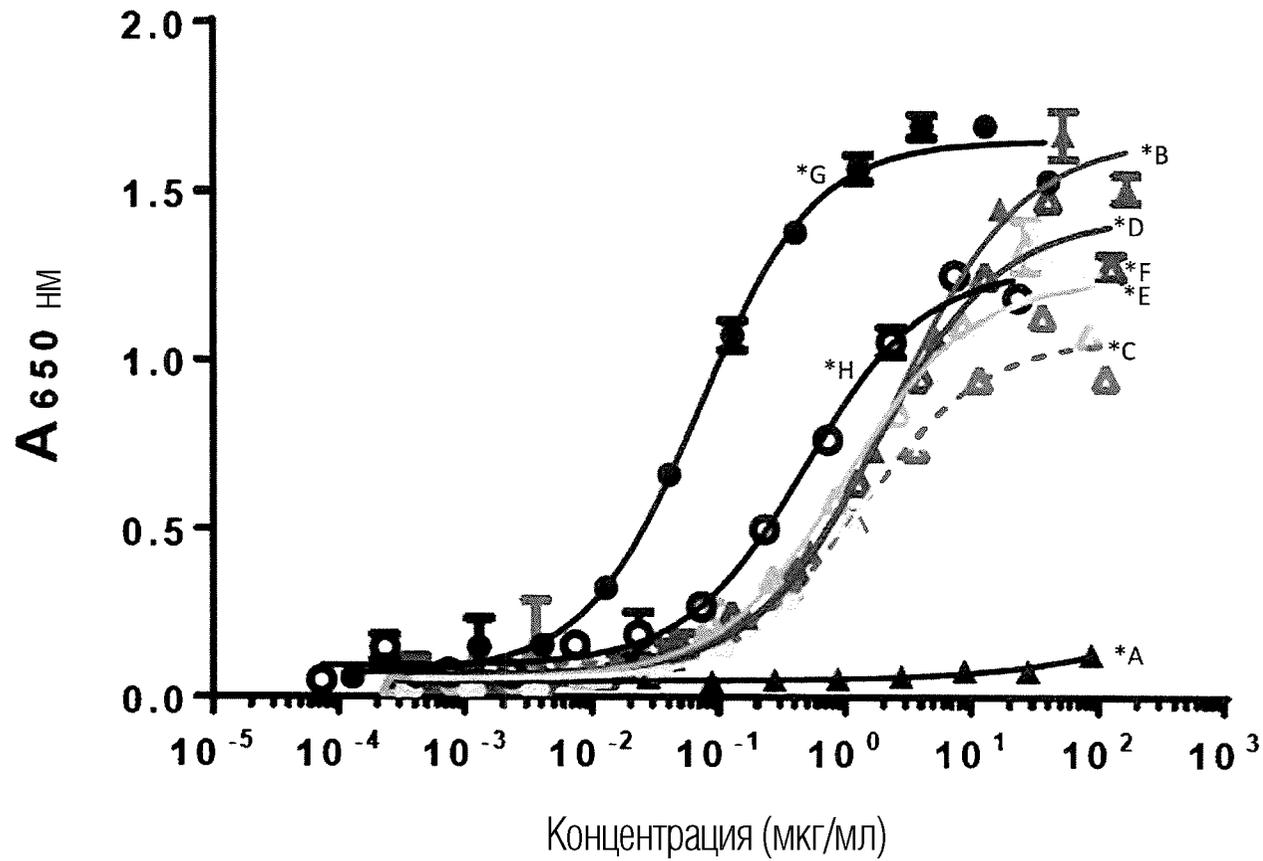
	cNT4X	RHB/RKA	RHB/RHB	mNT4X
Ec50 (мкг/мл)	0.2272	3.864	2.736	2.399

ФИГ. 6



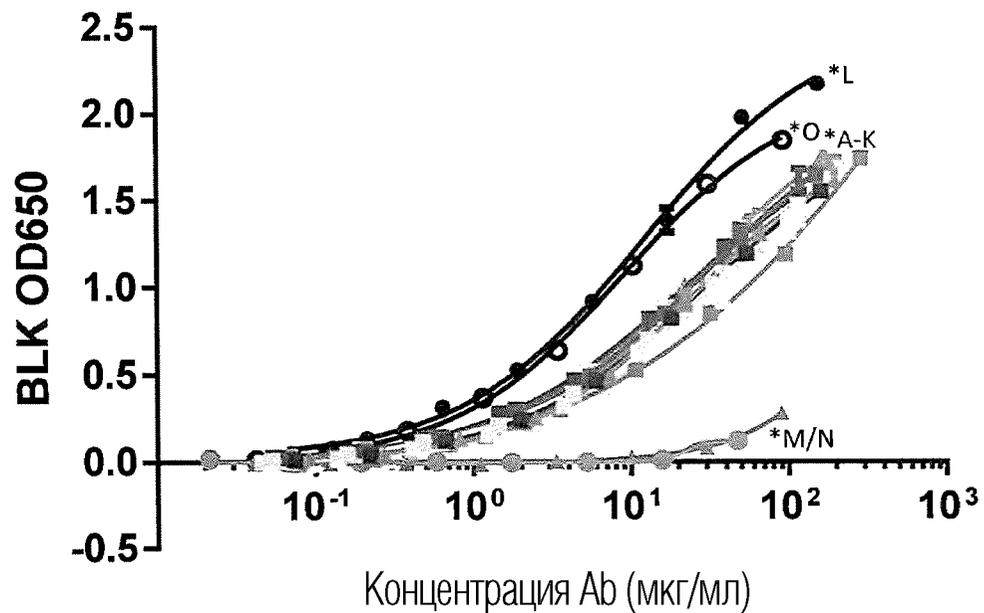
- | | |
|----------------|----------------|
| ▲ rcNT4X AA *D | ▲ rcNT4X IA *M |
| ▲ rcNT4X BA *E | ▲ rcNT4X KA *N |
| ▲ rcNT4X CA *F | ▲ rcNT4X LA *O |
| ▲ rcNT4X DA *G | ▲ rcNT4X MA *P |
| ▲ rcNT4X EA *H | ▲ rcNT4X NA *Q |
| ▲ rcNT4X FA *I | ▲ rcNT4X OA *R |
| ▲ rcNT4X GA *J | ▲ rcNT4X PA *S |
| ▲ rcNT4X HA *K | ▲ rcNT4X QA *T |
| ▲ rcNT4X JA *L | ▲ rcNT4X RA *U |
-
- | |
|-----------------------|
| ● cNT4X-167 *A |
| ○ mNT4X-167 (IgG1) *B |
| ◆ 1210 *C |

ФИГ. 7



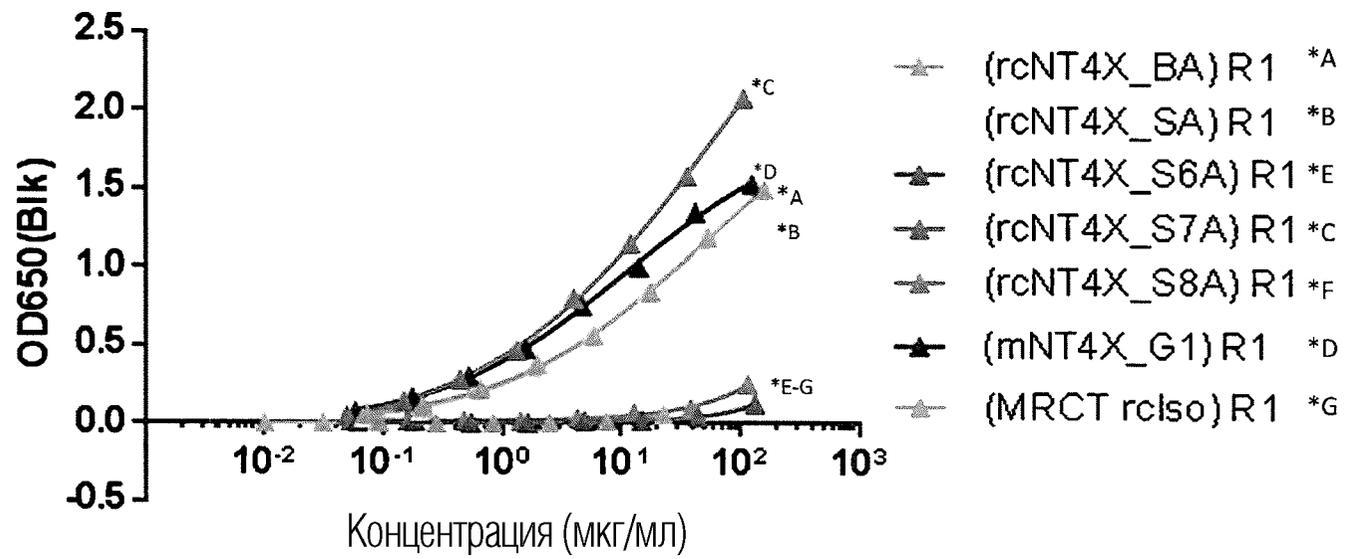
- ▲ rcNT4X AA *A
- ▲ rcNT4X BA *B
- ▲ rcNT4X LA *C
- ▲ rcNT4X MA *D
- ▲ rcNT4X OA *E
- ▲ rcNT4X RA *F
- cNT4X-167 *G
- mNT4X-167 (IgG1) *H

ФИГ. 8

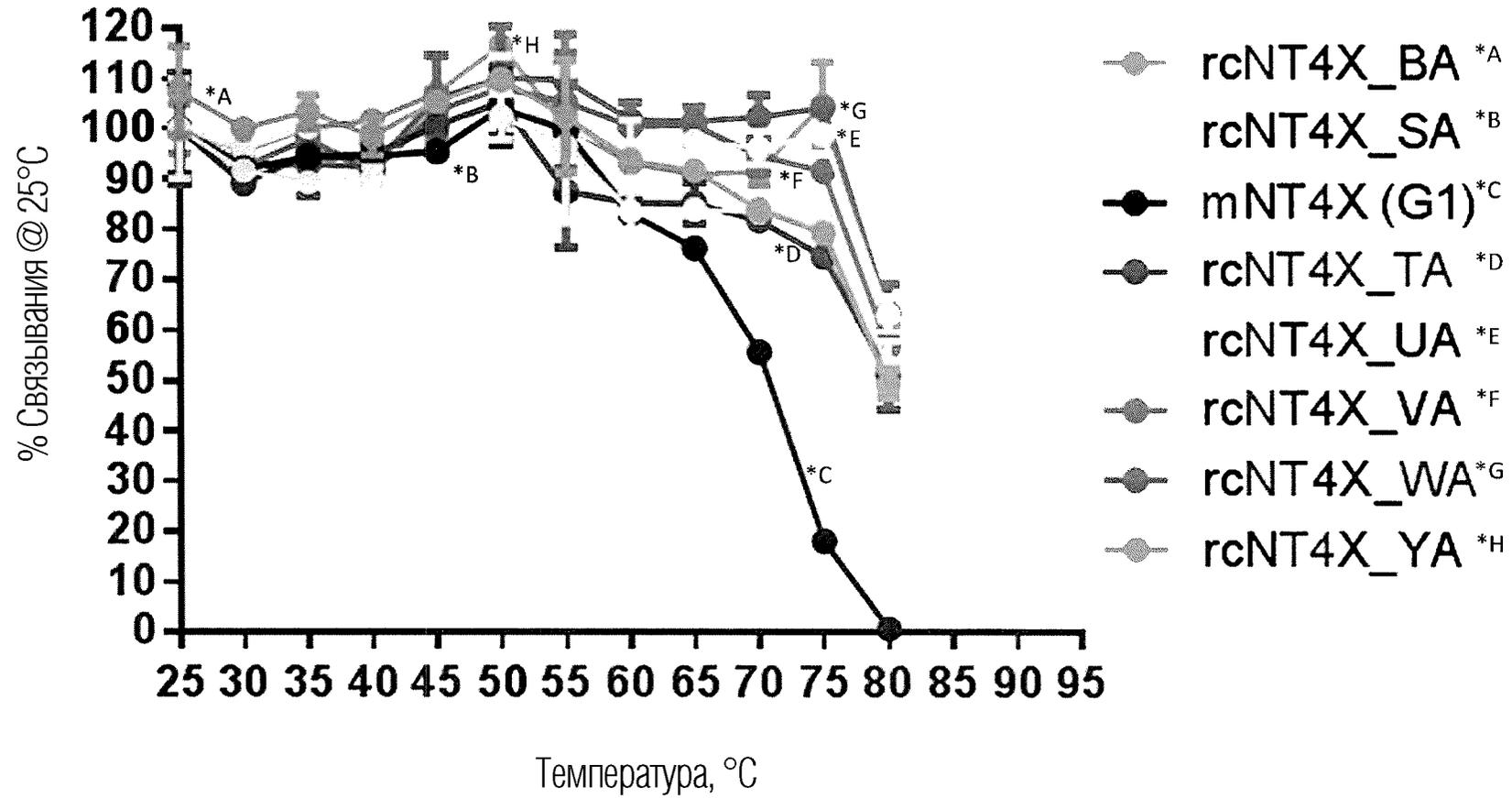


- ▲— rcNT4X_BA *A
- rcNT4X_SA(преп. 1) *B
- rcNT4X_TA *C
- rcNT4X_UA *D
- rcNT4X_VA *E
- rcNT4X_WA *F
- rcNT4X_YA *G
- rcNT4X_SA(Новый преп.) *H
- mNT4X *L
- MRCT_rcMoG1/KIso ct *M
- ▲— rcNT4X_AA (FR1) *N
- rcNT4X_BA (FR1) *I
- rcNT4X_SA (FR1) *J
- mNT4X (FR1) *O
- ▲— rcNT4X_BA-PL3 *K

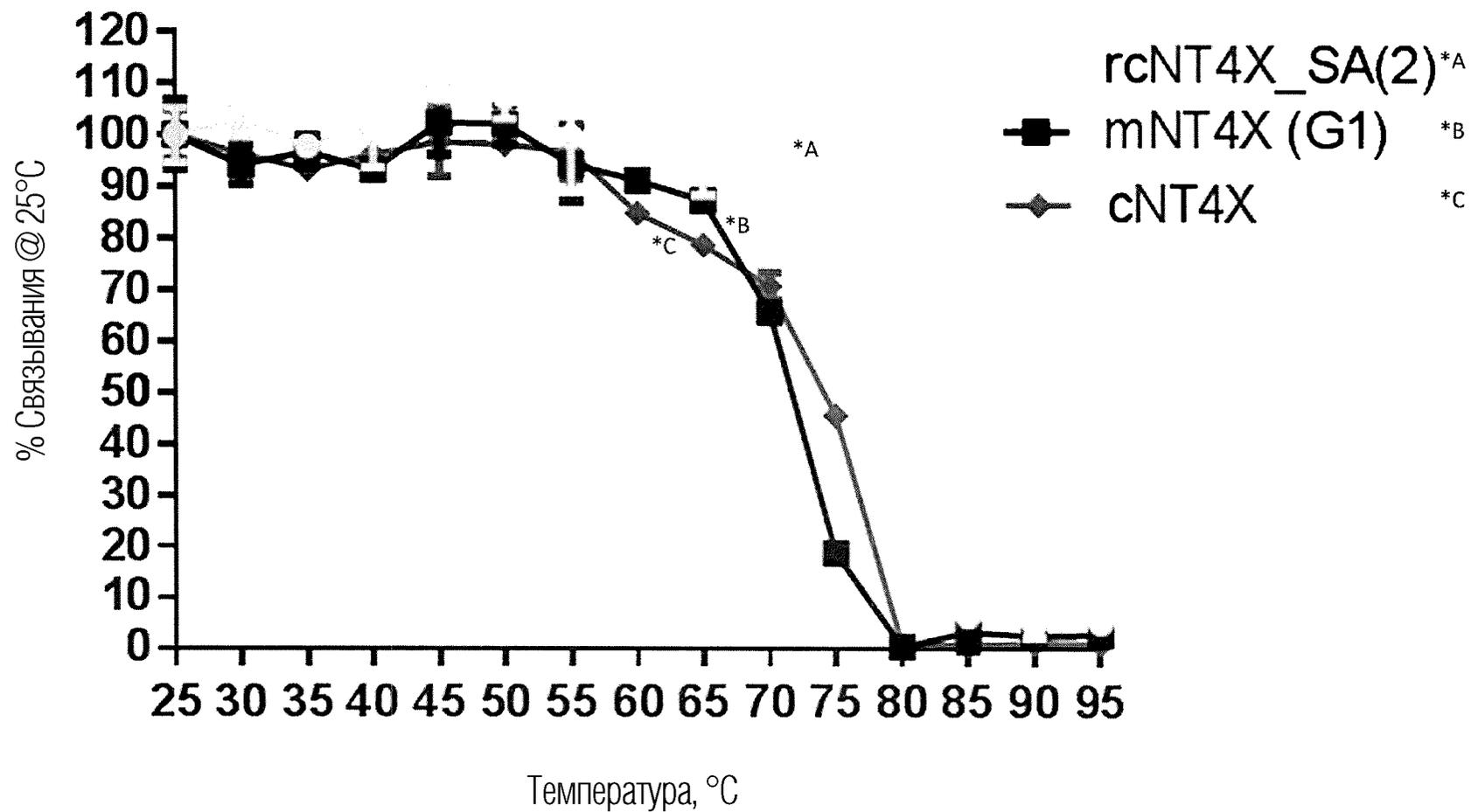
ФИГ. 9



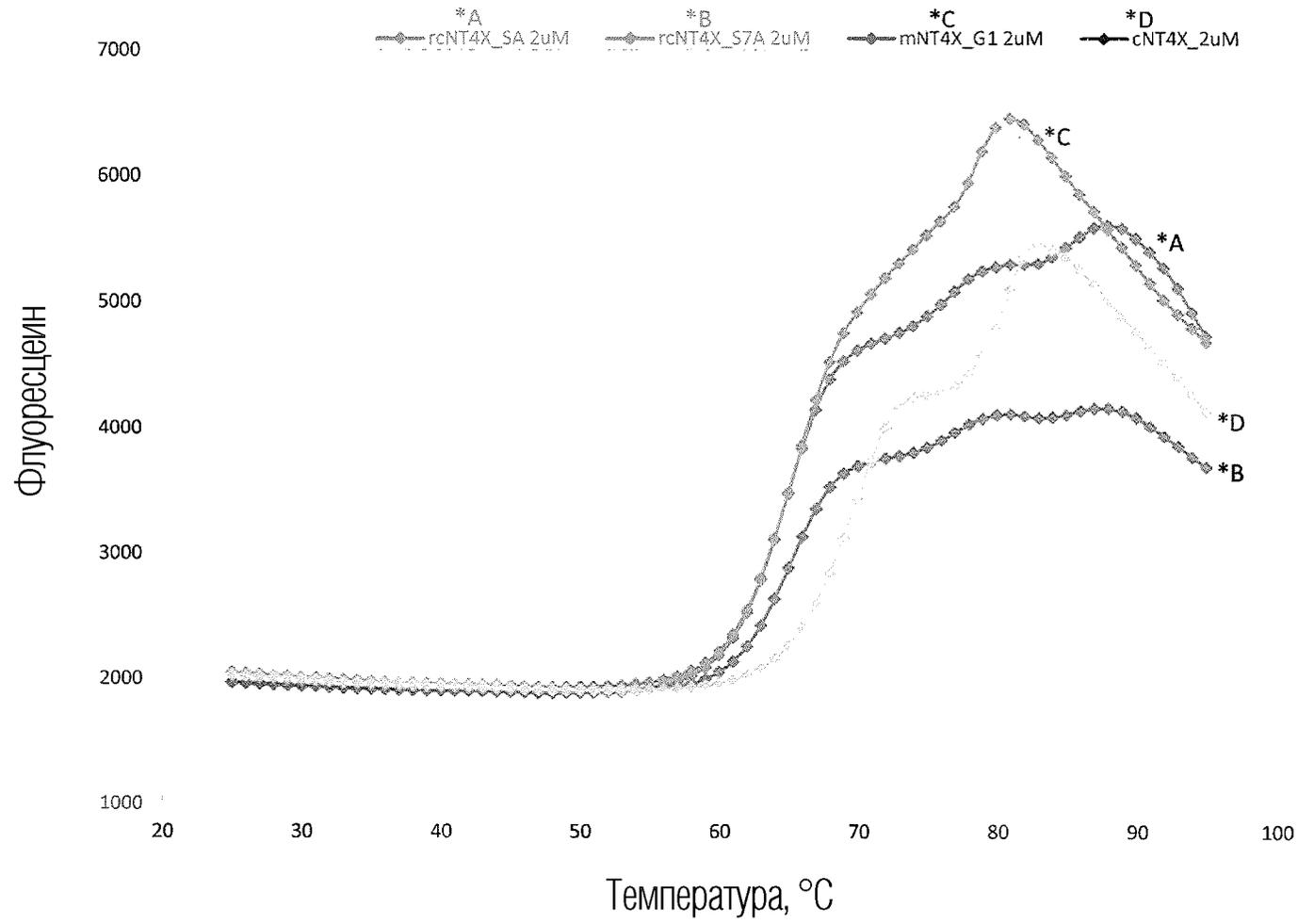
ФИГ. 10



ФИГ. 10 (продолжение)



ФИГ. 11

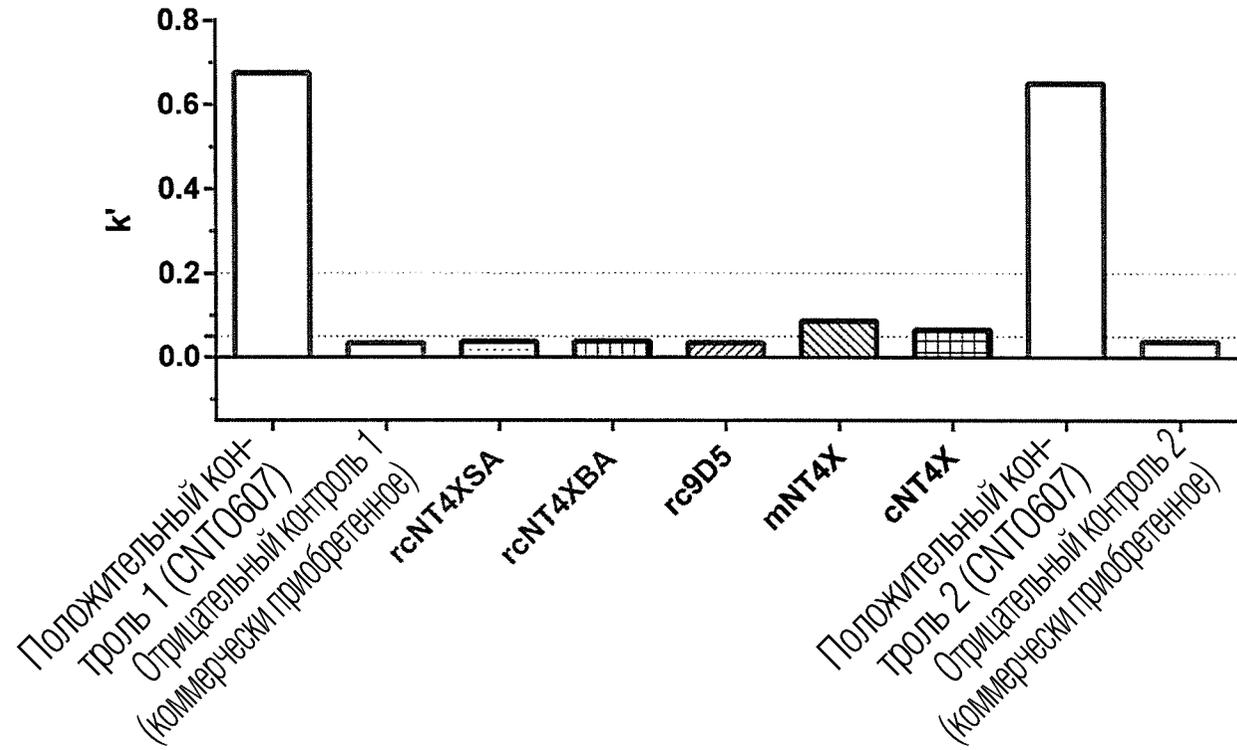


ФИГ. 11 (продолжение)

антитело	T_m первой фазы (°C)	T_m второй фазы (°C)	T_m третьей фазы (°C)	Среднее значение T_m
2uM rcNT4X_SA	65	77	85	67.5
2uM rcNT4X_S7A				66
2uM mNT4X	65.3	78.5		67.8
2uM cNT4X	69.2	80.3		72.8

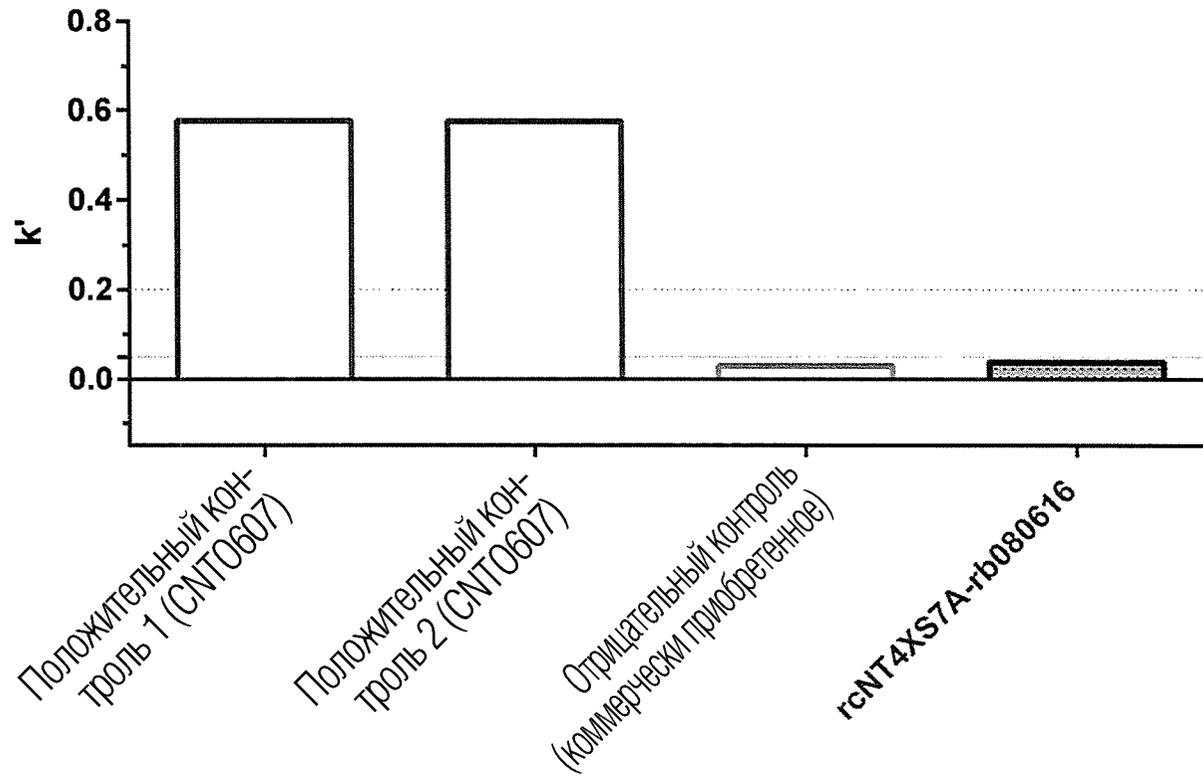
антитело	Преобразованное среднее значение T_m
rcNT4X_S7A (MoG1/k)	66
rcNT4X_SA (MoG1/K)	67
rcNT4X_BA (MoG1/K)	71
mNT4X(G1/K)	68
cNT4X (HuG1/K)	72
MRCTrcIsoMoG1K	68

ФИГ. 12



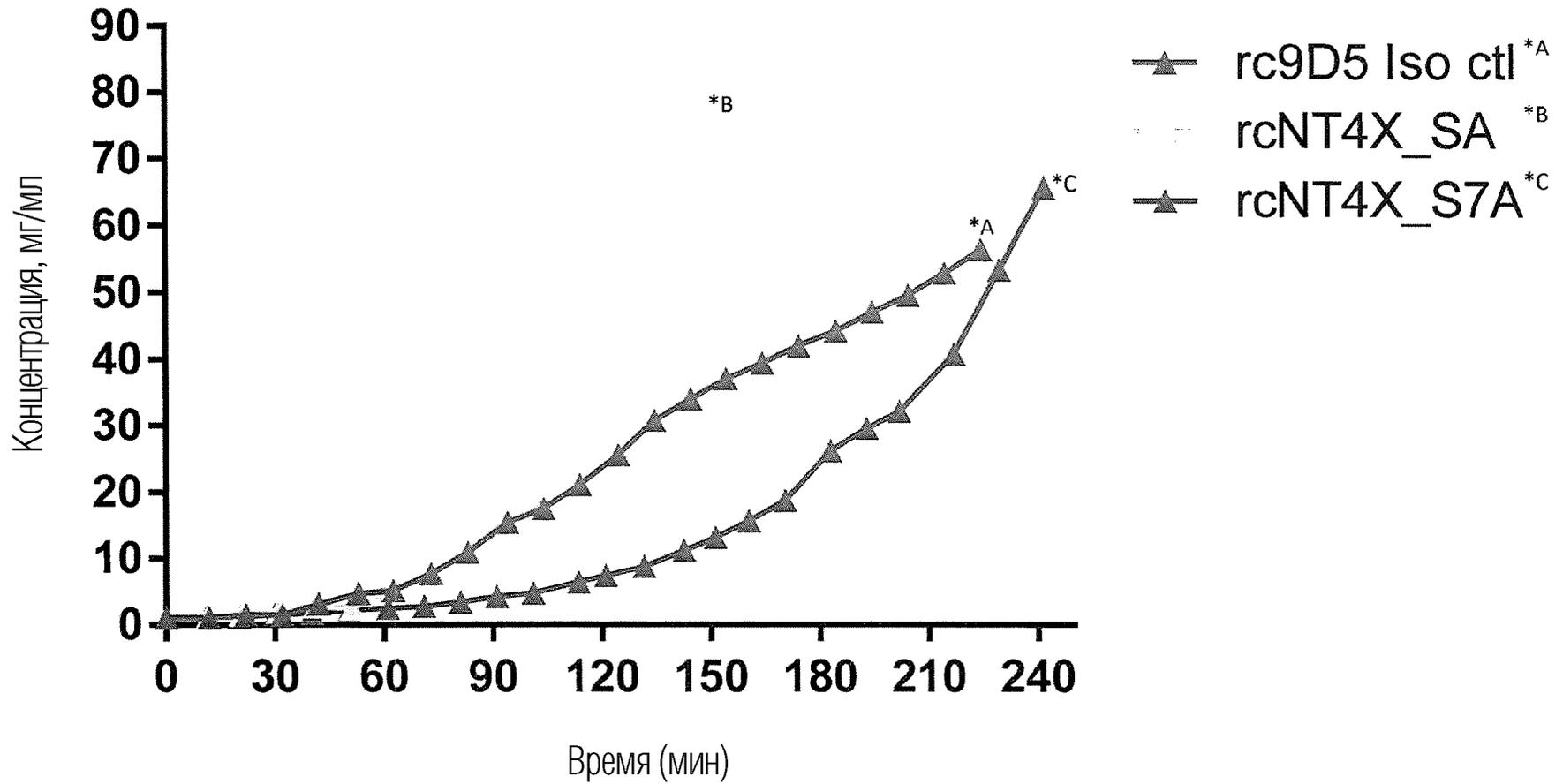
Образцы	CNT0607 1	CNT0607 2	rcNT4XSA	rcNT4XBA	rc9D5	mNT4X	cNT4X	Commercial mAb 1	Commercial mAb 2
Индекс удерживания K'	0.675	0.65	0.038	0.039	0.035	0.086	0.065	0.034	0.038

ФИГ. 13

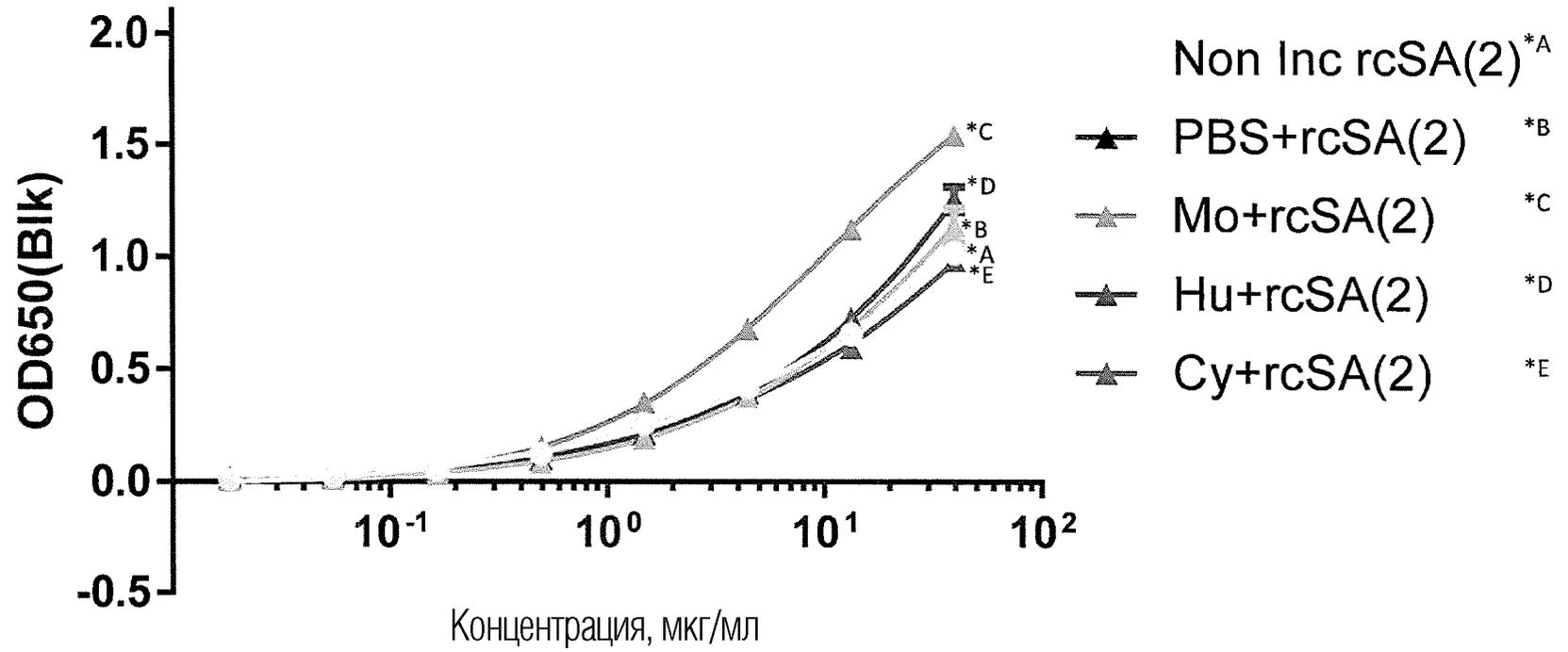


Образцы	CNT0607 1	CNT0607 2	Commercial mAb 1	rcNT4XS7A
Индекс удерживания K'	0.584	0.583	0.037	0.046

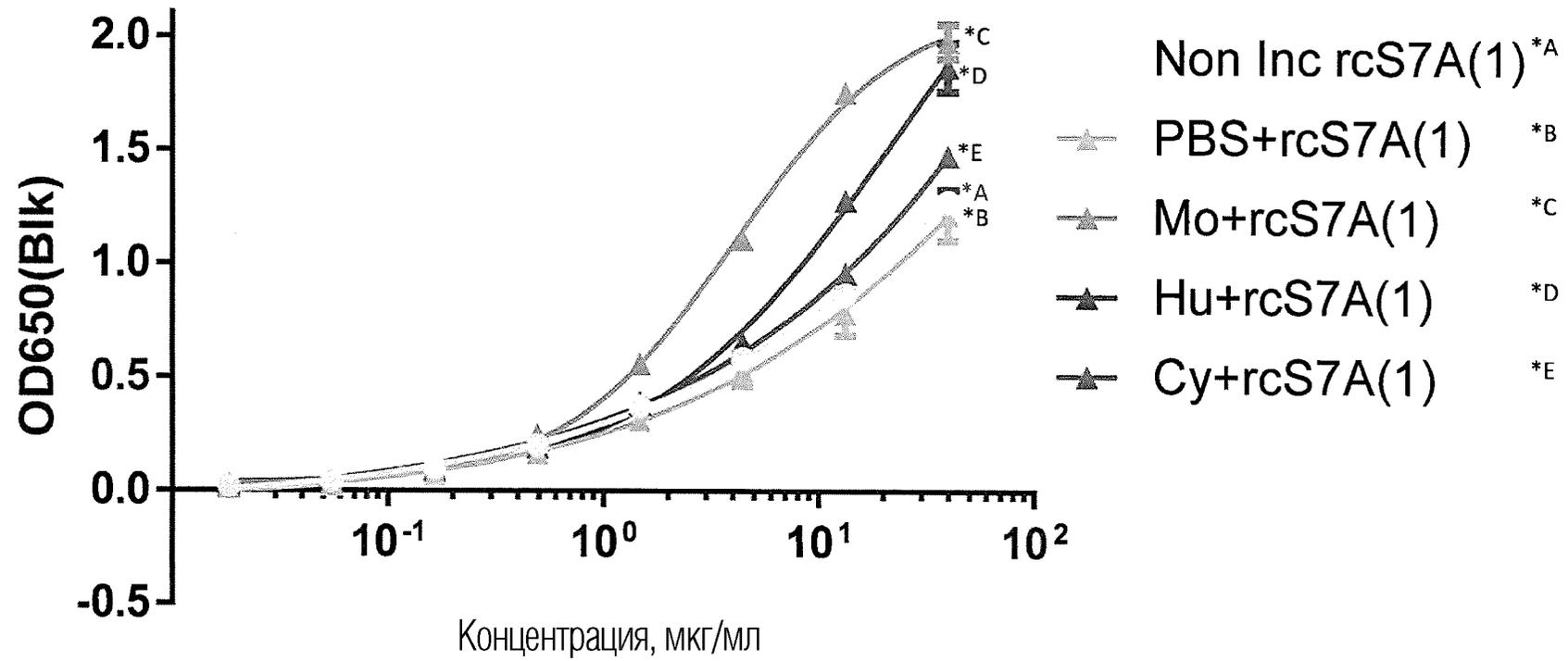
ФИГ. 14



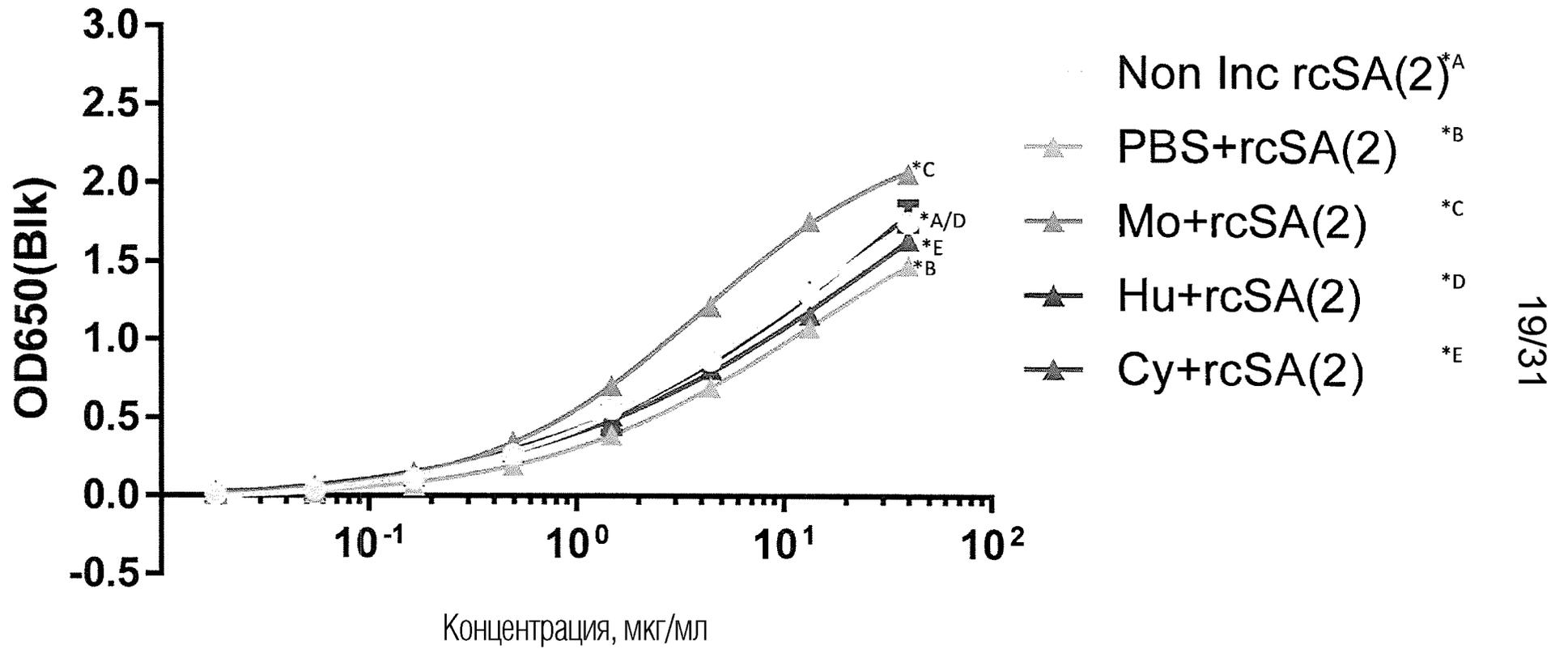
ФИГ. 15



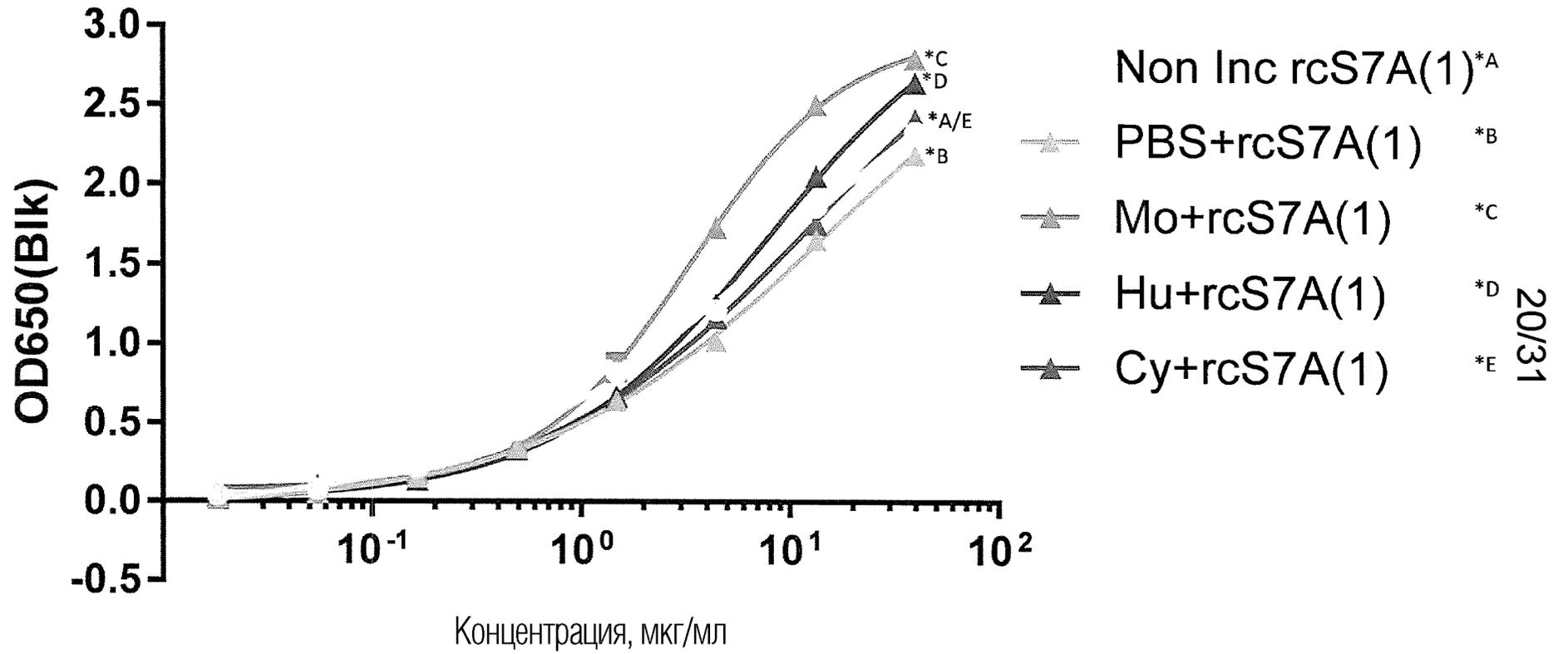
ФИГ. 15 (продолжение)



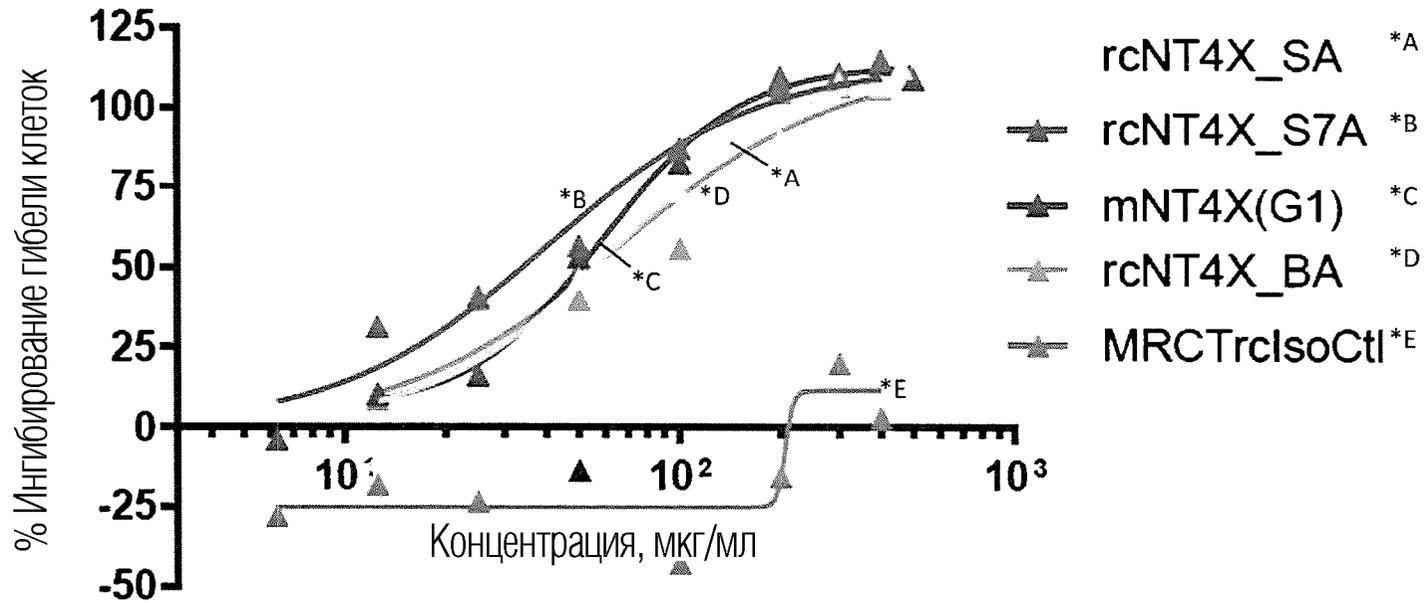
ФИГ. 16



ФИГ. 16 (продолжение)

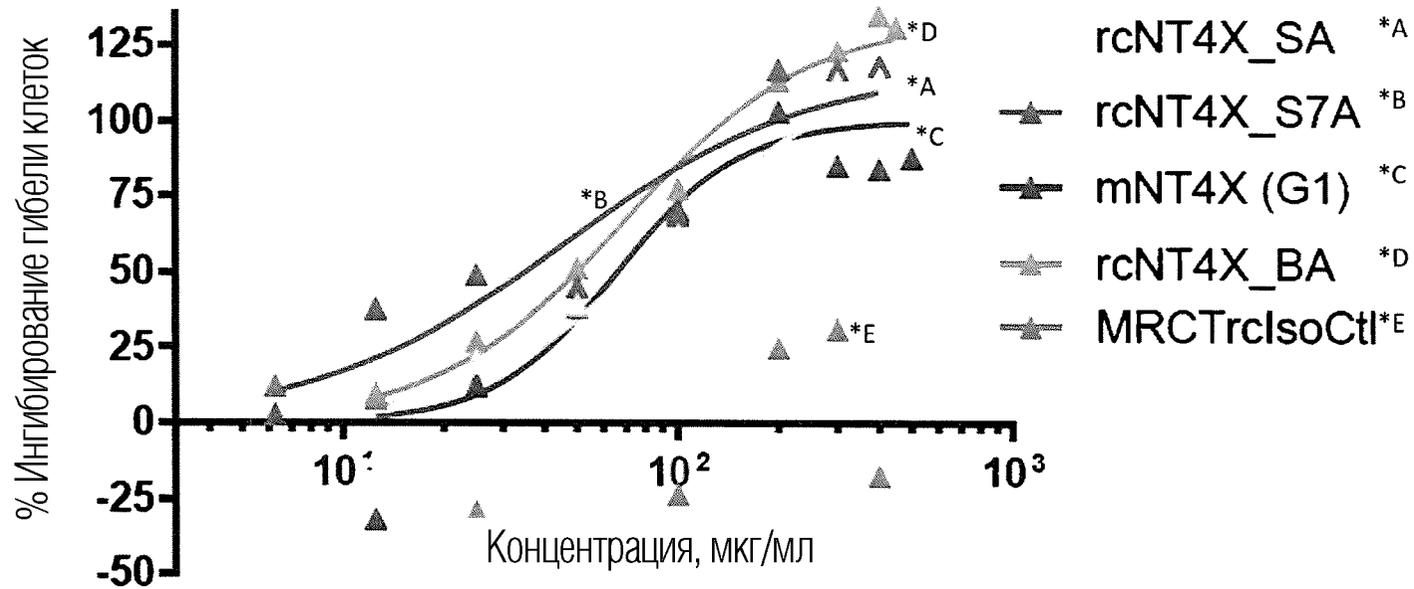


ФИГ. 17



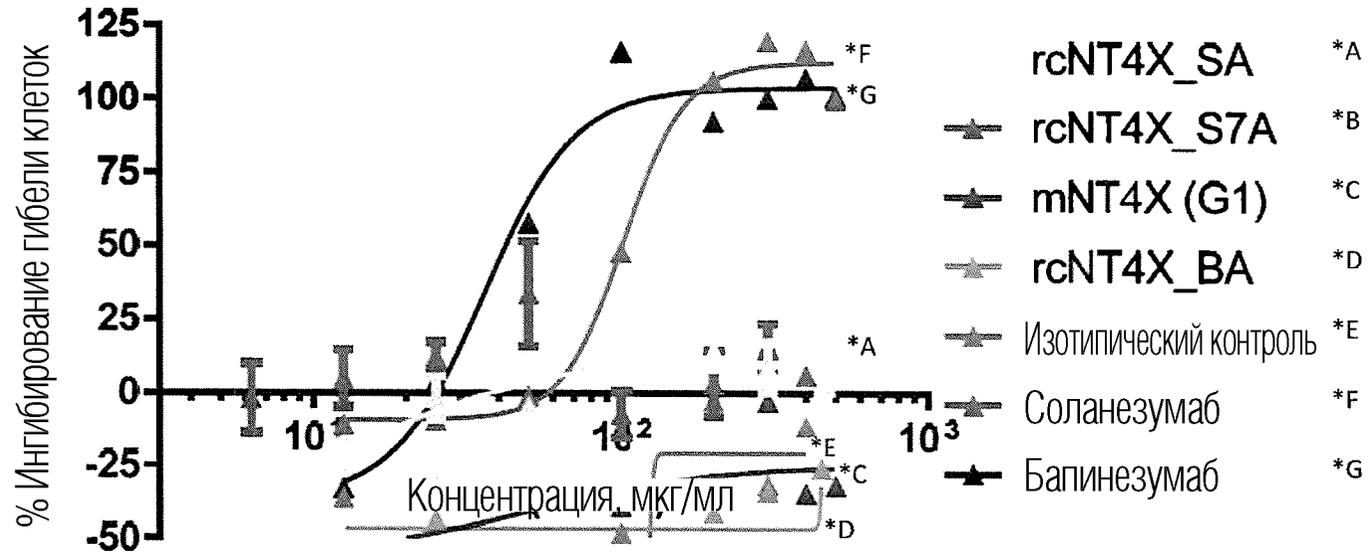
Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	65.5 (t/b= пост.)
rcNT4X_S7A	40.8 (t/b= пост.)
mNT4X(G1)	59.62
rcNT4X_BA	67.3 (t/b= пост.)
MRCTrclso ctl	-

ФИГ. 18



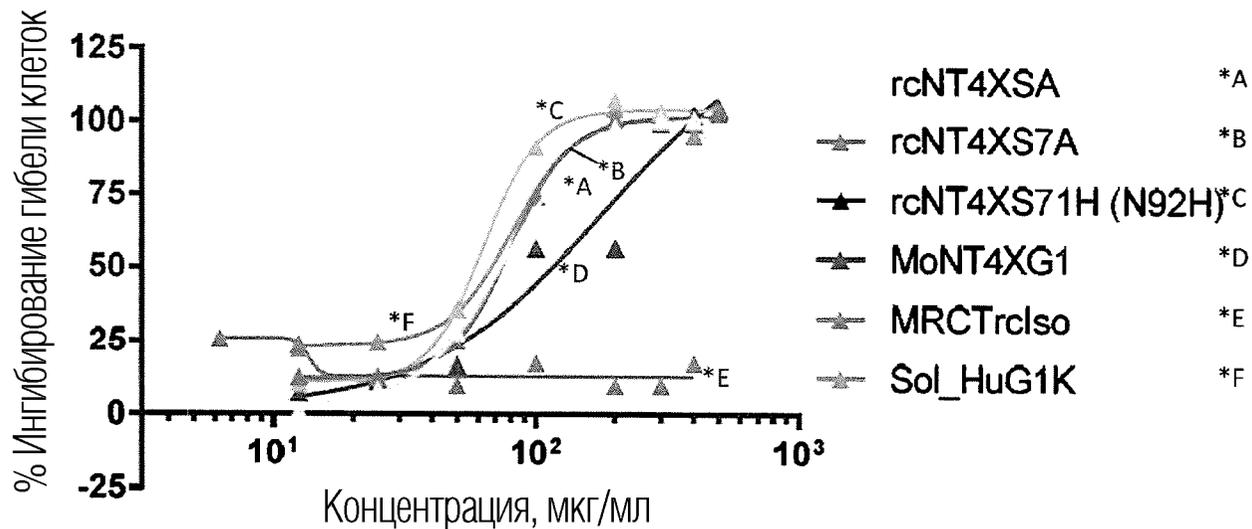
Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	88.68 (t/b= пост.)
rcNT4X_S7A	45.5 (t/b= пост.)
mNT4X(G1)	66.07 (t/b= пост.)
rcNT4X_BA	69.81 (t/b= пост.)
MRCTrclso ctl	-

ФИГ. 19



Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	-
rcNT4X_S7A	-
mNT4X(G1)	-
rcNT4X_BA	-
MRCTrlso ctl	-
Sol	102.2
Var	35.9

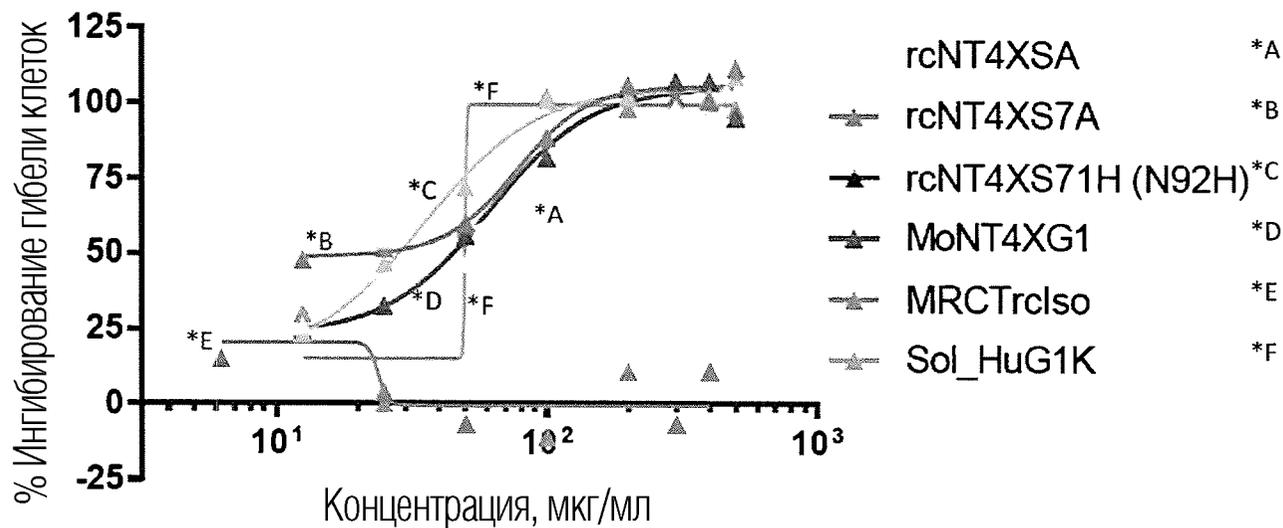
ФИГ. 20



Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	75.06
rcNT4X_S7A	80.42
rcNT4X_S71H	63.54
mNT4X(G1)	183.8
MRCTrclso ctl	-
Sol(HuG1k)	81.34

Ana4-42 (10 мкМ) n=2

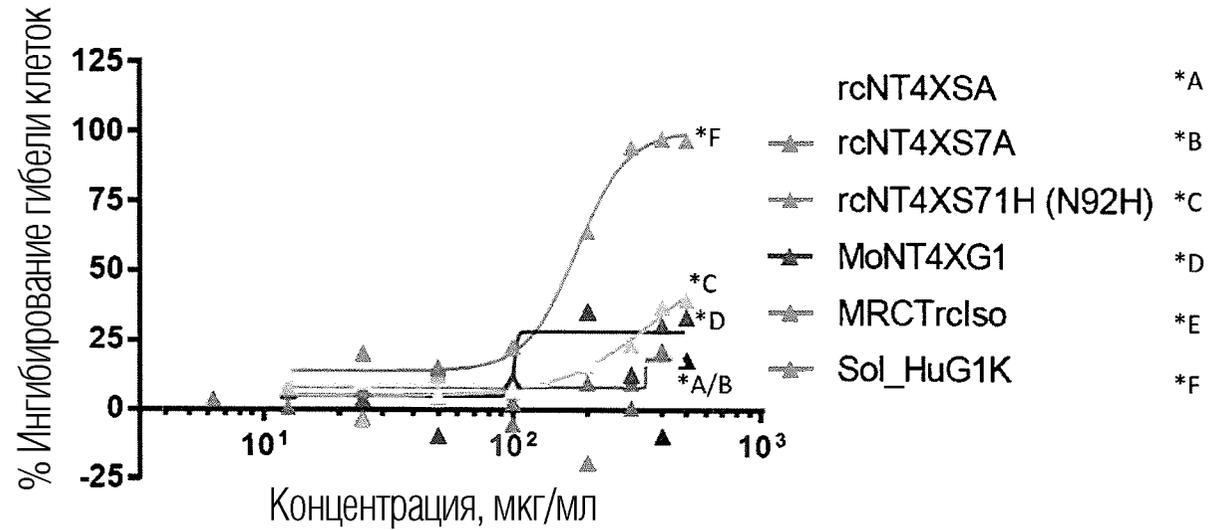
ФИГ. 21



Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	Amb
rcNT4X_S7A	77.03
rcNT4X_S71H	35.3
mNT4X(G1)	61.56
MRCTrclso ctl	-
Sol(HuG1k)	~49.98

CalpE3-42 (5 мкМ) n=2

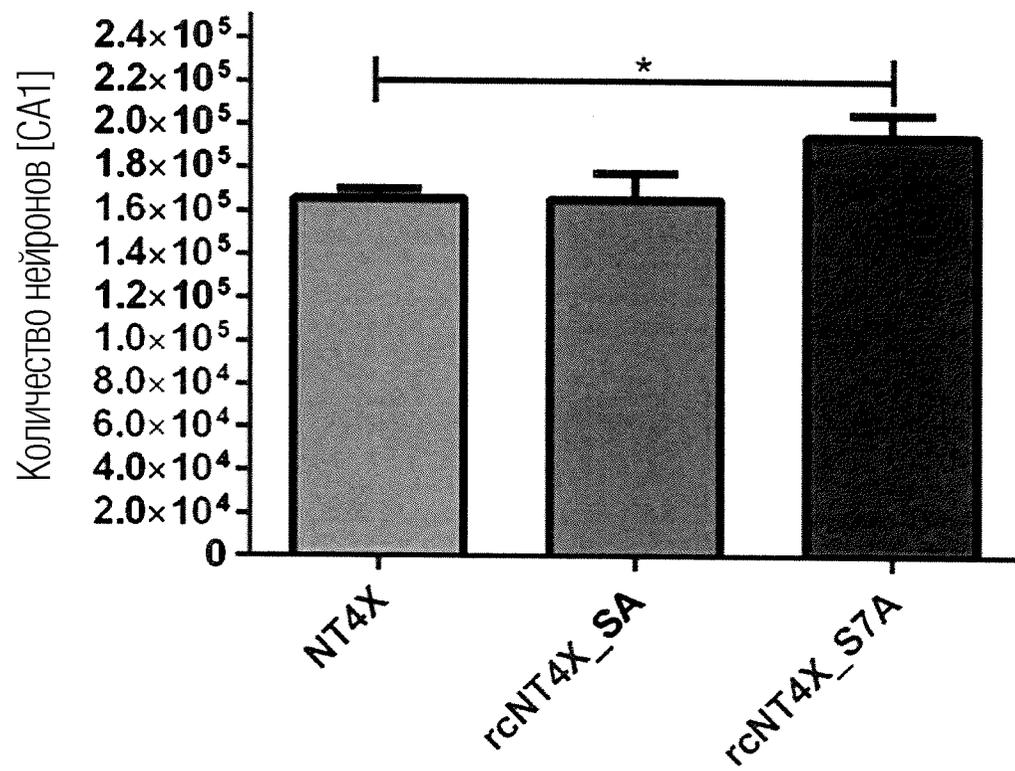
ФИГ. 22



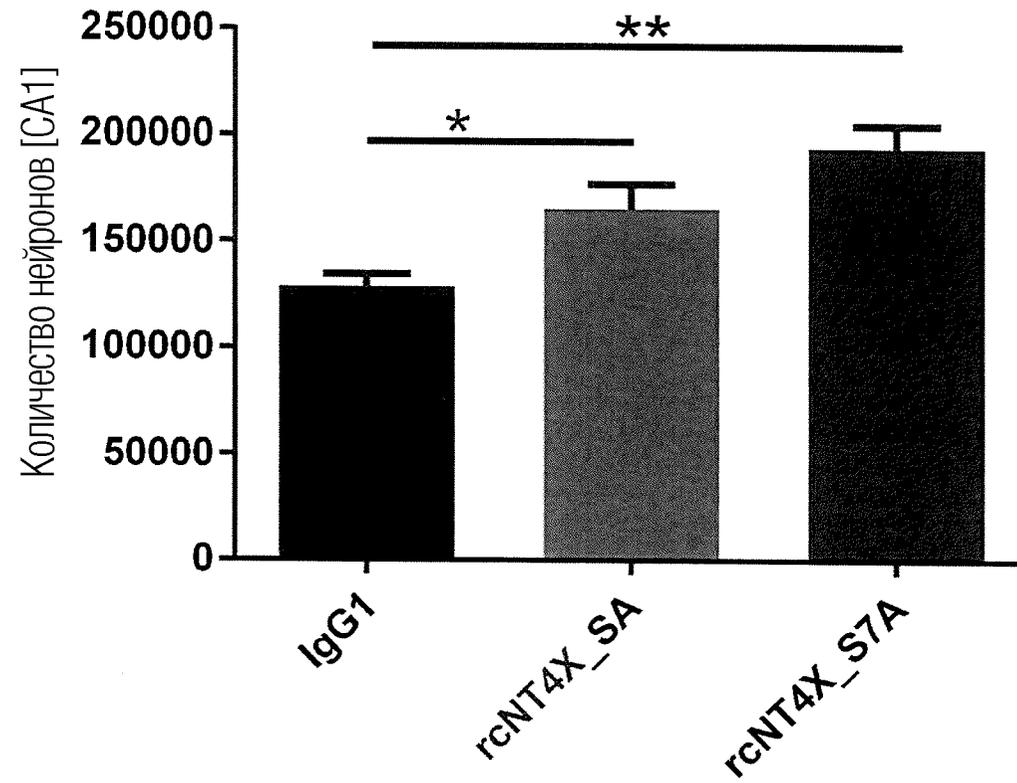
Антитело	IC50 (мкг/мл)
rcNT4X_SA	-
rcNT4X_S7A	-
rcNT4X_S71H	-
mNT4X(G1)	-
MRCTrclso ctl	-
Sol(HuG1k)	181.3

Ana1-42 (5 мкМ) n=2

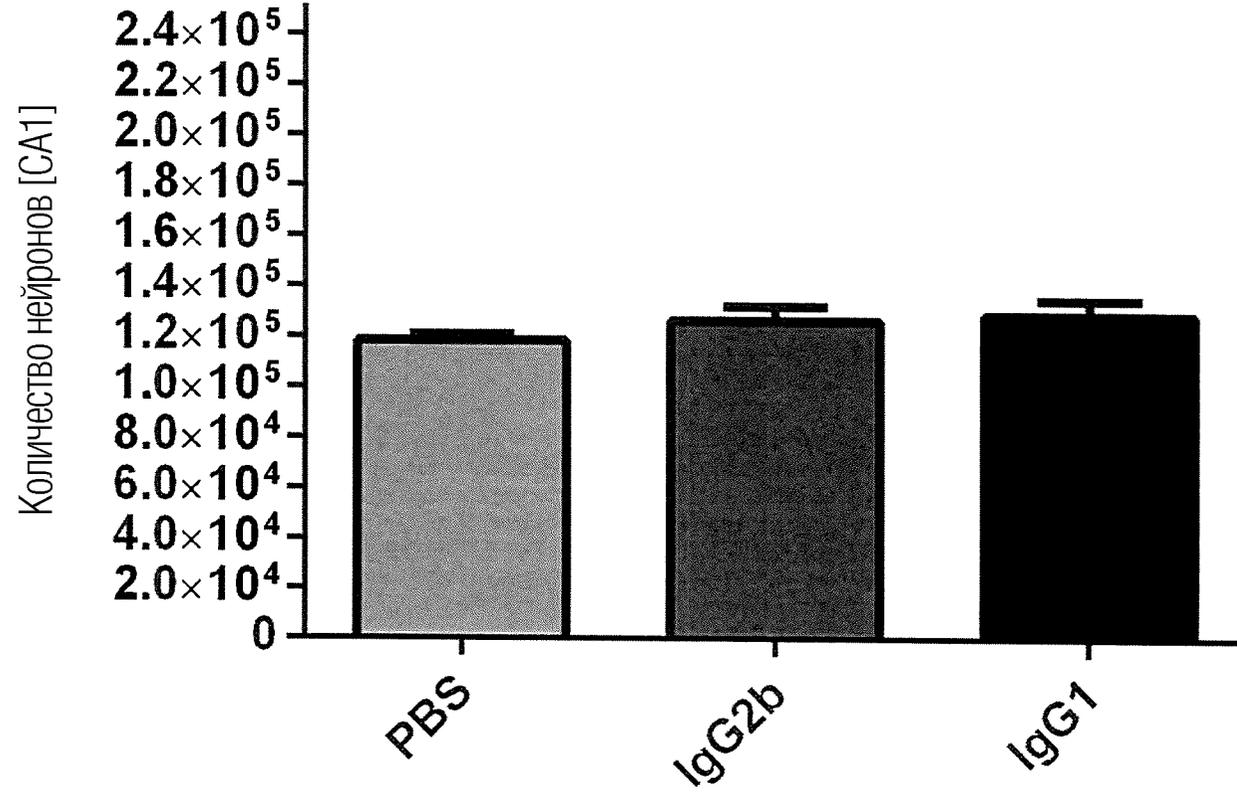
ФИГ. 23



ФИГ. 24

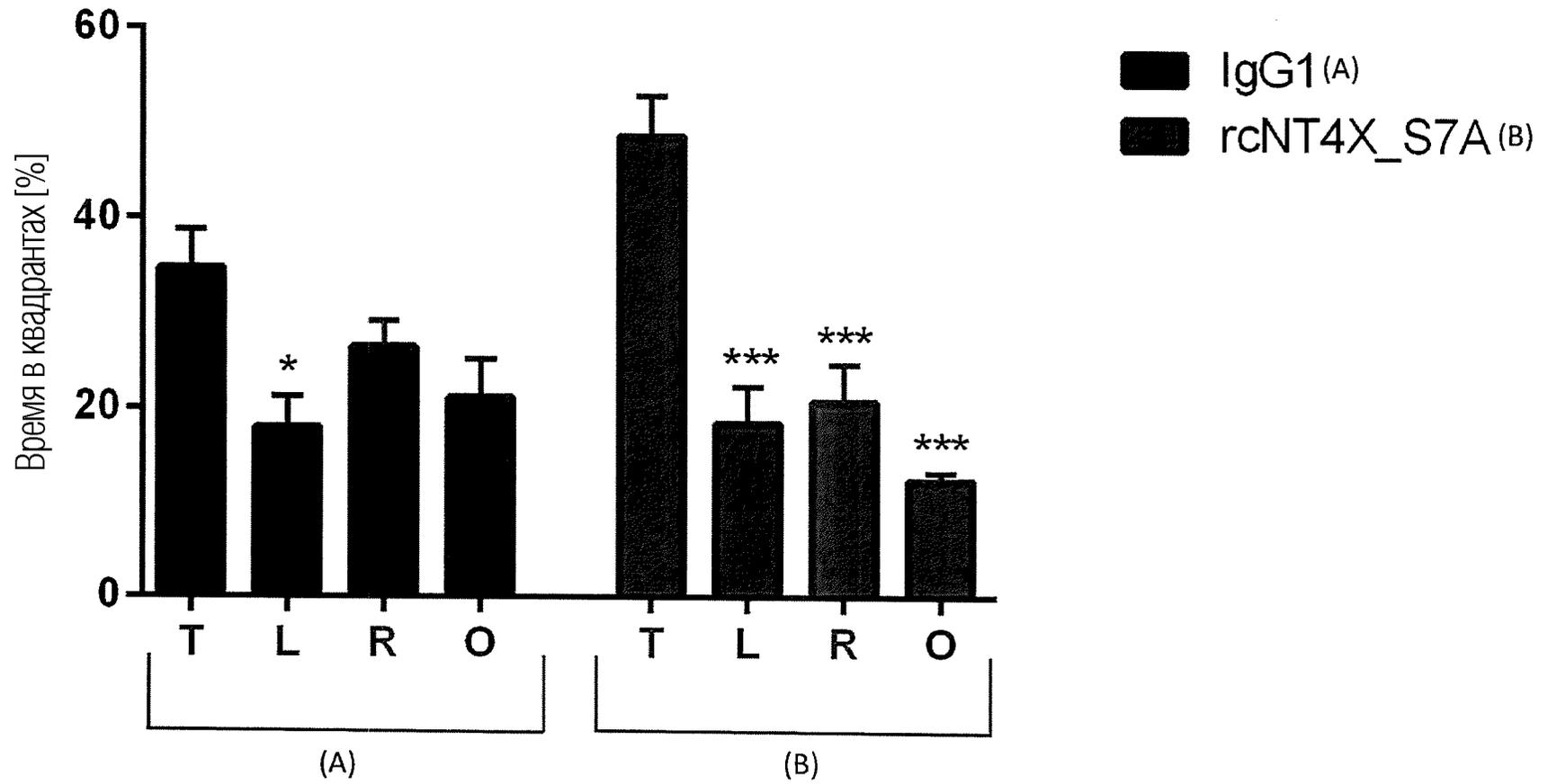


ФИГ. 25



ФИГ. 26

Испытание зонда в водном лабиринте Морриса



ФИГ. 27

