

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041243**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.29

(21) Номер заявки
201992163

(22) Дата подачи заявки
2018.04.16

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

(54) АНТИТЕЛА К БЕТА-АМИЛОИДНОМУ ПЕПТИДУ N3PGLU И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/487,550

(32) 2017.04.20

(33) US

(43) 2020.03.02

(86) PCT/US2018/027718

(87) WO 2018/194951 2018.10.25

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

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

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)**

(56) WO-A1-2012021469

WO-A2-2012021475

WO-A1-2016043997

JEFFREY L. CUMMINGS ET AL.:

"Alzheimers disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures", ALZHEIMERS RES THER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 6, no. 4, 3 July 2014 (2014-07-03), page 37, XP021191407, ISSN: 1758-9193, DOI: 10.1186/ALZRT269, Table 3; table 3

WO-A1-2017123517

WO-A1-2018005282

Sage C. Arbor ET AL.: "Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores", The Yale journal of biology and medicine, 1 March 2016 (2016-03-01), page 5, XP055479339, United States Retrieved from the Internet: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797837/pdf/yjbm_89_1_5.pdf, the whole document

WO-A1-2015175769

(57) Антитела к человеческому N3pGlu Aβ, композиции, содержащие такие антитела к N3pGlu Aβ, и способы применения таких антител к N3pGlu Aβ для лечения заболевания, характеризующегося отложением Aβ, включая клиническую или доклиническую стадию болезни Альцгеймера, синдром Дауна и клиническую или доклиническую стадию церебральной амилоидной ангиопатии.

B1

041243

041243

B1

Данное изобретение относится к антителам, которые связывают человеческий бета-амилоидный пептид N3pGlu, и их применению для лечения заболеваний, связанных с бета-амилоидным пептидом (в данном документе обозначается как A β или Абета).

Расщепление белка-предшественника амилоида приводит к A β пептидам размером от 38 до 43 аминокислот. Преобразование A β из растворимых в нерастворимые формы с высоким содержанием β -складок и отложение этих нерастворимых форм в виде невритных и цереброваскулярных бляшек в головном мозге было связано с рядом состояний и заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (AD), синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию (CAA).

Отложения, найденные в бляшках состоят из гетерогенной смеси A β пептидов. N3pGlu A β , также называемый N3pE, pE3-X или A β_{p3-x} , представляет собой N-концевую усеченную форму пептида A β и в основном обнаруживается в бляшках. N3pGlu A β лишен первых двух аминокислотных остатков на N-конце человеческого A β и имеет пироглутамат, который был получен из глутаминовой кислоты в третьем положении аминокислоты. Хотя N3pGlu A β пептид представляет собой минорный компонент осаждаемого A β в головном мозге, исследования показали, что N3pGlu A β пептид имеет агрессивные агрегационные свойства и накапливается в начале каскада отложения.

Антитела к N3pGlu A β известны в данной области. Например, патент США № 8679498 описывает человеческие N3pGlu A β антитела (например, B12L; также известное как LY3002813) и способы лечения заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, указанными антителами. Клиническое исследование продемонстрировало проблему присутствия антител (антитела к препарату/лекарственному средству) к антителу против N3pGlu A β (LY3002813). Антитела к препарату присутствовали в плазме почти всех, кто принимал участие в этом исследовании, и связанная с этим проблема с иммунной реакцией заключалась в сокращении периода полураспада LY3002813. Следовательно, все еще остается потребность в альтернативных анти-N3pGlu A β антителах.

Антитела по данному изобретению стремятся обеспечить анти-N3pGlu A β антитела, которые связывают N3pGlu A β , бляшки (A β_{1-42}) *in vivo*, но которые также демонстрируют пониженную иммуногенность. Такие анти-N3pGlu A β антитела также могут продемонстрировать уменьшенное неспецифическое связывание с белками плазмы. Кроме того, такие анти-N3pGlu A β антитела могут также обеспечивать уменьшенный предсказанный T-зависимый ответ опосредованный Ат. Такие анти-N3pGlu A β антитела могут также обеспечивать увеличенный период полужизни антител и улучшенный профиль безопасности для потенциального лекарственного препарата человека с фармакокинетикой для лучшей схемы дозирования. Антитела в объеме данного изобретения стремятся обладать по меньшей мере одной из этих желательных характеристик.

Данное изобретение относится к антителу, которое связывает человеческий N3pGlu A β , содержащему LCVR и HCVR, где указанный LCVR содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и где указанный HCVR содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и где аминокислотные последовательности представляют собой SEQ ID NO: 4 или 5 для LCDR1, SEQ ID NO: 6 или 7 для LCDR2, SEQ ID NO: 8 для LCDR3, SEQ ID NO: 1 для HCDR1, SEQ ID NO: 2 для HCDR2 и SEQ ID NO: 3 для HCDR3. В конкретном варианте осуществления изобретения анти-N3pGlu A β антитело содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 для LCDR1, SEQ ID NO: 6 для LCDR2, SEQ ID NO: 8 для LCDR3, SEQ ID NO: 1 для HCDR1, SEQ ID NO: 2 для HCDR2 и SEQ ID NO: 3 для HCDR3. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, анти-N3pGlu A β антитело содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 для LCDR1, SEQ ID NO: 7 для LCDR2, SEQ ID NO: 8 для LCDR3, SEQ ID NO: 1 для HCDR1, SEQ ID NO: 2 для HCDR2 и SEQ ID NO: 3 для HCDR3.

Данное изобретение также обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β , причем указанное антитело содержит переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, и переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β , где указанное антитело содержит переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В другом конкретном варианте осуществления изобретения данное изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β , где указанное антитело содержит переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β , содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 13 или 14, и аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 12. В более конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β ,

содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 13, и аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 12. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с человеческим N3pGlu A β , содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представляет собой SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность HC представляет собой SEQ ID NO: 12. В дополнительном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу, содержащему две LC и две HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 13 или 14, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 12. В более конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу, содержащему две LC и две HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 13, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 12. В более конкретном варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к антителу, содержащему две LC и две HC, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность каждой HC представляет собой SEQ ID NO: 12.

Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело по данному изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей. Кроме того, данное изобретение относится к способу лечения заболевания, характеризующегося отложением A β , включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу лечения заболевания, характеризующегося отложением A β , включающему введение эффективного количества антитела по данному изобретению. В частности, данное изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния, выбранного из клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии САА, включающему введение указанному пациенту эффективного количества антитела по данному изобретению. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу лечения или профилактики клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии САА, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело данного изобретения. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния, выбранного из продромальной AD (иногда также называемой умеренным когнитивным нарушением, связанным с A β , или MCI), легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающей введение пациенту, нуждающемуся в этом, необходимого эффективного количества антитела по данному изобретению. В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния, выбранного из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающего введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностированы доклиническая стадия болезни Альцгеймера, клиническая стадия болезни Альцгеймера, синдром Дауна или клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. Более конкретно, данное изобретение дополнительно обеспечивает способ замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностировано состояние, выбранное из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом таком варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностированы доклиническая стадия болезни Альцгеймера, клиническая стадия болезни Альцгеймера, синдром Дауна или клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии, включающий введение эффективного количества антитела по данному изобретению. Более конкретно, данное изобретение дополнительно обеспечивает способ замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностировано состояние, выбранное из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение эффективного количества антитела по данному изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение предлагает способ замедления функционального снижения у пациента, у которого диагностирована доклиническая стадия болезни Альцгеймера или клиническая стадия болезни Альцгеймера, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. Более конкретно, данное изобретение обеспечивает способ замедления функционального снижения у пациента, у которого диагностировано состояние, выбранное из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом таком варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу замедления функ-

ционального снижения у пациента, у которого диагностирована доклиническая стадия болезни Альцгеймера или клиническая стадия болезни Альцгеймера, включающему введение эффективного количества антитела по данному изобретению. Более конкретно, данное изобретение обеспечивает способ замедления функционального снижения у пациента, у которого диагностировано состояние, выбранное из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD, включающий введение эффективного количества антитела по данному изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу снижения нагрузки Аβ амилоидной бляшки на головной мозг у пациента, у которого диагностирована доклиническая или клиническая стадия болезни Альцгеймера, включающему введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. Более конкретно данное изобретение относится к способу снижения нагрузки Аβ амилоидной бляшки на головной мозг у пациента, у которого диагностировано состояние, выбранное из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD или тяжелой AD, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у бессимптомного пациента, включающему введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, пациент имеет низкие уровни Аβ1-42 в спинномозговой жидкости (СМЖ) или бляшек Аβ в головном мозге.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу лечения бессимптомных пациентов, о которых известно, что они имеют генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу лечения бессимптомных пациентов, о которых известно, что у них имеется генетическая мутация, вызывающая болезнь Альцгеймера PSEN1 E280A (мутация Пайса), включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает способ лечения бессимптомных пациентов с генетической мутацией, такой как мутация в гене APP, PSEN1 или PSEN2, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у бессимптомных пациентов, о которых известно, что они имеют генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у бессимптомных пациентов, о которых известно, что у них имеется генетическая мутация, вызывающая болезнь Альцгеймера PSEN1 E280A (мутация Пайса), включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом конкретном варианте изобретения данное изобретение обеспечивает способ предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у бессимптомных пациентов с генетической мутацией, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу замедления когнитивных нарушений у бессимптомного пациента, о котором известно, что он имеет генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера, включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу замедления когнитивных нарушений у бессимптомных пациентов, о которых известно, что у них имеется генетическая мутация, вызывающая болезнь Альцгеймера PSEN1 E280A (мутация Пайса), включающему введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению. В другом конкретном варианте изобретения данное изобретение относится к способу замедления когнитивных нарушений у бессимптомных пациентов с генетической мутацией, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению.

В данном изобретении также предложено антитело по данному изобретению для применения в терапии. В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения при лечении заболевания, характеризующегося отложением Аβ. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение обеспечивает антитело по данному изобретению для применения в лечении клинической или доклинической стадий болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, или клинической или доклинической стадий церебральной амилоидной ангиопатии. В

Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Данное изобретение также относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и/или молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, причем клетка способна экспрессировать антитело, содержащее HC, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и LC, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Предпочтительно клетка млекопитающего содержит молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления изобретения

бретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию CHO или HEK.

В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу получения антитела, содержащего LCVR, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HCVR, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или ДНК, кодирующую HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше. Данное изобретение также относится к способу получения антитела, содержащего LCVR, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и HCVR, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и/или HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

В другом варианте осуществления изобретения данное изобретение относится к способу получения антитела, содержащего LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше. Данное изобретение также относится к способу получения антитела, содержащего LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, содержащей ДНК, кодирующую LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и/или HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и восстанавливается экспрессированное антитело. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Данное изобретение включает способ получения антитела, причем это антитело содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 13, и этот процесс включает: а) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше. Данное изобретение также включает способ получения антитела, причем это антитело содержит две HC и две LC, в которых аминокислотная последовательность каждой из двух HC представляет собой SEQ ID NO: 12, а аминокислотная последовательность каждой из двух LC представляет собой SEQ ID NO: 14, и этот процесс включает: а) культивирование клетки млекопитающего по изобретению, как описано выше, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и б) восстановление экспрессированного антитела. Изобретение включает антитело, получаемое способом по изобретению, как описано непосредственно выше.

Антитела по данному изобретению связываются с N3pGlu A β . Последовательность N3pGlu A β представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и варианты его карбоксильного конца. Примеры вариантов карбоксильного конца N3pGlu A β включают A β _{p3-40} и A β _{p3-43}.

Используемый в данном документе термин "антитело" обозначает молекулу иммуноглобулина, содержащую две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой LC и HC включает вариативный участок, ответственный за распознавание антигена через определяющие комплементарность участки (CDR), содержащиеся в них. CDR перемежаются с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками. Назначение аминокислот доменам CDR в участках LCVR и HCVR антител по данному изобретению основано на хорошо известном соглашении нумерации по Кабат (Kabat et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), и Северной конвенции по нумерации (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406: 228-256 (2011)).

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

Антитела по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела ("мАт"). Моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью гибридомных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например, CDR-трансплантации, или комбинаций таких или других технологий, известных в данной области. В другом

варианте осуществления данного изобретения антитело или кодирующая его нуклеиновая кислота предоставлены в изолированной форме. Используемый в данном документе термин "выделенный" относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не обнаружены в природе и не содержат или практически не содержат другие макромолекулярные вещества, обнаруженные в клеточной среде. Термин "по существу не содержат", как используется в данном документе, означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат более чем 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более чем 90% и более предпочтительно более чем 95%.

После экспрессии и секреции антитела, среду осветляют для удаления клеток, а осветленную среду очищают с использованием любого из многих обычно используемых методов. Очищенное антитело может быть составлено в фармацевтических композициях в соответствии с хорошо известными способами изготовления белков и антител для парентерального введения, особенно для подкожного, интратекального или внутривенного введения. Антитело может быть лиофилизировано вместе с подходящими фармацевтически приемлемыми наполнителями, а затем позднее восстановлено разбавителем на водной основе перед использованием. Альтернативно, антитело может быть приготовлено в водном растворе и храниться до 1-3 лет до использования. В любом случае форма для хранения и форма для инъекции фармацевтических композиций антитела будут содержать фармацевтически приемлемый наполнитель или наполнители, которые представляют собой ингредиенты, отличные от антитела. Является ли ингредиент фармацевтически приемлемым, зависит от его влияния на безопасность и эффективность или на чистоту и эффективность фармацевтической композиции. Если считается, что ингредиент оказывает достаточно неблагоприятное влияние на безопасность или эффективность (или на чистоту или эффективность), чтобы гарантировать, что он не используется в композиции для введения людям, то он не является фармацевтически приемлемым для использования в фармацевтической композиции антитела.

Фармацевтическую композицию, содержащую антитело по данному изобретению, можно вводить пациенту с риском или проявлением заболеваний или расстройств, как описано в данном документе, первичными путями (например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным). Подкожные и внутривенные пути являются предпочтительными. Фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит "эффективное" количество антитела по данному изобретению. Эффективное количество относится к количеству, необходимому (в дозировках и в течение периодов времени и для средств введения) для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также от способности антитела вызывать необходимый ответ у индивида. Эффективное количество может быть легко определено лечащим диагностом или медицинским работником, таким как специалист в данной области, с использованием известных методик и наблюдением результатов. Частота дозирования зависит от фактической фармакокинетики и фармакодинамики у людей. Продолжительность лечения будет варьироваться в зависимости от многих факторов и будет определяться диагнозом пациента или лечащим врачом на основании опыта и навыков в данной области. Частота и продолжительность лечения могут варьироваться в зависимости от показаний. Термины "лечение", "проведение лечения" или "лечить" и тому подобное включают в себя сдерживание, замедление или остановку прогрессирования или тяжести существующего симптома, состояния, заболевания или расстройства у пациента. Термин "пациент" относится к человеку. Термины "предотвращать" и "предотвращение" означает профилактическое введение антитела по данному изобретению бессимптомному пациенту с тем, чтобы сдерживать у пациента имеющиеся симптомы или клинические признаки нейродегенеративных заболеваний, таких как AD.

Термин "состояние, характеризуемое отложением A β ", представляет собой заболевание, которое патологически характеризуется отложениями A β в головном мозге или в сосудистой системе головного мозга. Это включает в себя такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия. Клинический диагноз, стадия или прогрессирование болезни Альцгеймера может быть легко определен лечащим диагностом или медицинским работником, таким как специалист в данной области с использованием известных методов и путем наблюдения результатов. Это, как правило, включает в себя некоторую форму представления о бляшках головного мозга, оценку психического или когнитивного расстройства (например, рейтинг клинической деменции - сводные данные боксов (CDR-SB), мини-экзамен по психическому состоянию (MMSE) или когнитивная шкала оценки болезни Альцгеймера (ADAS-Cog)) или функциональную оценку (например, кооперативное исследование болезни Альцгеймера- активность повседневной жизни (ADCS-ADL). "Клиническая стадия болезни Альцгеймера", как используется в данном описании, представляет собой диагностированную стадию болезни Альцгеймера. Оно включает состояния, диагностированные как продромальная болезнь Альцгеймера, легкая болезнь Альцгеймера, умеренная болезнь Альцгеймера и тяжелая болезнь Альцгеймера. Термин "доклиническая стадия болезни Альцгеймера" представляет собой стадию, которая предшествует клинической стадии болезни Альцгеймера, где измеримые изменения в биомаркерах (таких как уровни A β 42 СМЖ или нагрузка отложений бляшки на головной мозг с помощью ПЭТ амилоида) указывают на самые ранние признаки у пациента с патологией Альцгеймера, прогрессирующей до клинической стадии бо-

лезни Альцгеймера. Обычно это происходит до того, как становятся заметны такие симптомы, как потеря памяти и спутанность сознания.

Следующие примеры и анализы демонстрируют, что антитела по данному изобретению полезны для лечения заболевания, характеризующегося отложением Аβ, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и САА. Однако следует понимать, что следующие Примеры изложены в качестве иллюстрации, а не ограничения, и что специалистом в данной области техники могут быть сделаны различные модификации.

Примеры

Экспрессия и очистка сконструированных антител N3pGlu Aβ

N3pGlu Aβ антитела по данному изобретению, могут быть экспрессированы и очищены по существу, следующим образом. Вектор экспрессии глутаминсинтетазы (GS), содержащий последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 13 или 14, и последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 12, используется для трансфекции клеточной линии яичника китайского хомячка (CHO) методом электропорации. Вектор экспрессии кодирует промотор SV Early (Simian Virus 40E) и ген GS. После трансфекции клетки подвергают массовой селекции с 0-50 мкМ L-метионинсульфоксима (MSX). Выбранные массы клеток или мастер-лунки затем масштабируются в бессывороточных суспензионных культурах, которые будут использоваться для производства.

Осветленную среду, в которую было секретировано антитело, наносят на аффинную колонку с Белком А, которая была уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатно-солевой буфер (pH 7,4). Колонку промывают 1 М NaCl для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело N3pGlu Aβ элюируют, например, цитратом натрия при pH (прибл.) 3,5 и фракции нейтрализуют 1 М трис-буфером. Фракции антитела N3pGlu Aβ обнаруживают, например, с помощью SDS-PAGE или аналитического исключения по размеру, а затем объединяют. N3pGlu Aβ антитело по данному изобретению, концентрируют в любом ФСБ буфере при pH 7,4 или 10 мМ Na-цитратного буфера, 150 мМ NaCl при pH около 6. Конечный материал может быть стерильно отфильтрован с использованием обычных методов. Чистота антитела N3pGlu Aβ составляет более чем 95%. N3pGlu Aβ антитело по данному изобретению может быть немедленно заморожено при -70°C или сохранено при 4°C в течение нескольких месяцев. Аминокислотные SEQ ID NO для приведенных в качестве примеров антител по данному изобретению показаны ниже.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности приведенных в качестве примеров антител N3pGlu Aβ

SEQ ID NO антитела				
Антитело	Легкая цепь	Тяжелая цепь	LCVR	HCVR
201c	13	12	10	9
201cYD	14	12	11	9

SEQ ID NO антитела			
Антитело	LCDR1	LCDR2	LCDR3
201c	4	6	8
201cYD	5	7	8

SEQ ID NO антитела			
Антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3
201c и 201cYD	1	2	3

Кинетика и авидность связывания

Кинетику и авидность связывания N3pGlu Aβ антитела с пептидом pE3-42 Aβ измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore® 3000 (GE Healthcare). Авидность связывания измеряют путем иммобилизации около 120 RU пептида pE3-42 Aβ посредством аминного связывания на чипе Biacore® CM5 и протекания антитела N3pGlu Aβ, начиная с 500 нМ в 2-кратном серийном разведении до 15,6 нмоль. Эксперименты проводят при 25°C в буфере HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4). Для каждого цикла, 250 мкл образца антитела пропускают через ячейку потока 1 и 2 при 50 мкл/мин, а затем диссоциируют в течение 10 мин. Поверхность чипа регенерируют с 5 мкл инъекции глицинового буфера при pH 1,5 при 10 мкл/мл потока. Данные соответствуют модели привязки Ленгмюра 1:1 для получения k_{on} , k_{off} и для вычисления K_D . Следуя процедурам, по существу, как описано выше, были соблюдены следующие параметры (показанные в табл. 2).

Таблица 2. Кинетика и avidность связывания

Антитело		k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
201с	Среднее	1,64E+03	6,98E-05	4,57E-08
	S. D.	3,88E+02	1,36E-05	2,06E-08
201сYD	Среднее	2,41E+03	6,39E-05	2,67E-08
	S. D.	2,01E+02	2,15E-06	2,61E-09

Эти данные демонстрируют, что антитела по данному изобретению связывают pE3-42 A β .

Ex Vivo связывание с мишенью

Для определения связывания с мишенью ex vivo на срезах головного мозга из фиксированного PDAPP мозга проводят иммуногистохимический анализ с экзогенно добавленными антителами N3pGlu A β по данному изобретению или антителом H3B 201с. Антитело 201с H3B отличается на одну аминокислоту от антитела 201с, и это различие находится в HCDR3 тяжелой цепи (Тут в положении 10 в HCDR3 201с представляет собой Phe в 201с H3B). Антитело 201с H3B содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную SEQ ID NO: 13.

Серийные криостатные коронарные срезы старых PDAPP мышей (в возрасте 26 или 20 месяцев) инкубируют с 5 или 20 мкг/мл примера антитела N3pGlu A β по данному изобретению (201с или 201сYD). Используют вторичные реагенты HRP, специфичные для человеческого IgG, и отложенные бляшки визуализируют с помощью DAB-Plus (DAKO). Биотинилированное мышинное антитело 3D6, за которым следует вторичный Step-HRP, используют в качестве положительного контроля.

Приведенные в качестве примера антитела N3pGlu A β по данному изобретению помечены как отложенные A β в этих срезах мозга. Однако наблюдалось более высокое фоновое окрашивание для антитела 201с H3B при экзогенной концентрации 20 мкг/мл. Эти гистологические исследования продемонстрировали, что приведенные в качестве примера антитела PN3pGlu A β по данному изобретению связывали отложенную A β мишень ex vivo.

Фагоцитоз ex vivo

Анализ фагоцитоза ex vivo проводят с целью выяснения, могут ли антитела N3pGlu A β по данному изобретению способствовать микроглиальному фагоцитозу бляшки. Замороженные срезы головного мозга человека с болезнью Альцгеймера (20 мкм) предварительно инкубируют с 10 мкг/мл приведенного в качестве примера антитела N3pGlu A β по данному изобретению (201с или 201сYD), контролями или антителом 201с H3B в течение 1 ч при 37°C в 24-луночных планшетах. На обработку приходится четыре лунки. Первичные мышинные клетки микроглии (8 $\times$ 10⁵; C57/BL6) затем добавляют и инкубируют в течение 24 ч. Ткань в каждой лунке гомогенизируют в 5,2 М гуанидиновом буфере и содержание A β ₁₋₄₂ оценивают по ИФА. Поскольку содержание A β может варьироваться на протяжении нескольких срезов, для каждой тестовой лунки реализован контроль дочернего среза, а содержание тестовой лунки нормализовано по отношению к тому же срезу.

По сравнению с образцами положительного контроля иллюстративные N3pGlu A β антитела по данному изобретению (201с и 201сYD) и 201с H3B имели значительно сниженный A β ₁₋₄₂. Образцы отрицательного контроля имели незначительный клиренс отложенного A β ₁₋₄₂. Следовательно, анализы фагоцитоза ex vivo показывают, что приведенные в качестве примера β N3pGlu A β антитела по данному изобретению могут очищать бляшки ex vivo путем фагоцитоза.

In Vivo связывание с мишенью

Измеряется способность N3pGlu A β антител согласно данному изобретению пересекать гематоэнцефалический барьер и связываться с осажденной бляшкой in vivo. Старым трансгенным мышам PDAPP (18,5 до 32-месячного возраста) внутрибрюшинно вводили N3pGlu A β антитела (201с) или IgG отрицательного контроля. Шесть мышей на группу получают одну инъекцию 40 мг/кг антитела в день 1 и в день 3. Связывание с мишенью in vivo определяют на 6-й день, когда мышей умерщвляют и собирают мозг для гистохимического анализа.

Степень связывания мишеней in vivo количественно определяют как относительную площадь, положительную для связывания N3pGlu A β антител in vivo, нормированную по общей площади бляшек, как определено с помощью иммуноокрашивания экзогенного антитела 3D6 на сестринских срезах (соотношение TE). Соотношение TE генерируется путем измерения относительной площади связанного антителом, и нормализации значения по отношению к общей относительной площади возможной цели (общее отложение A β визуализируется с помощью экзогенной иммуногистохимии с антителом положительного контроля (3D6) на сестринском срезе).

Следуя процедурам, по существу, как описано выше, антитело 201с имело соотношение TE 2,8%. Антитело 201с продемонстрировало in vivo связывание с мишенью в гиппокампе и в ограниченной степени в коре, тогда как у животных, которым вводили контрольный IgG, не было окрашивания, специфичного для бляшек.

In Vivo очистка бляшек

Исследования проводят с химерными суррогатными антителами с LCVR и HCVR 201с или 201с НЗВ, слитыми с константным участком каппа мыши и Fc IgG2a, для оценки *in vivo* очистки бляшек у старых мышей PDAPP. Старым мышам PDAPP (возраст 21 месяц, $n = 23-25$ в группе) подкожно вводят один раз в неделю в течение 7 недель 12,5 мг/кг химерного антитела 201с, химерного антитела 201с НЗВ или контрольного IgG. Контрольных старых мышей PDAPP (умерщвленных в начале исследования) используют для оценки уровней существовавшего отложения перед терапевтическим лечением.

В конце исследования конечные уровни лекарственного средства измеряются в плазме, а мозг оценивается с помощью ИФА для уровней $A\beta_{1-42}$. Старые мыши PDAPP находятся на пределе бляшек, о чем свидетельствует незначительное дальнейшее накопление $A\beta_{1-42}$ в течение 7-недельного периода лечения контрольным IgG. Группа химерных антител 201с и группа химерных антител 201с НЗВ демонстрируют значительное снижение $A\beta_{1-42}$ (26%, $p < 0,0182$ и 26%, $p = 0,0121$ соответственно) по сравнению с контролем. Уровень воздействия антител измеряли в конце 7-недельного периода дозирования, и химерное 201с имело уровень 91 мкг/мл, а 201с НЗВ имело уровень 56 мкг/мл. Это исследование продемонстрировало, что представленное в качестве примера химерное N3pGlu $A\beta$ антитело 201с способно уменьшать бляшки ($A\beta_{1-42}$) *in vivo*.

Отсутствие связывания плазмы с низкой аффинностью

Исследования *in vitro* проводят для изучения потенциальных низкоаффинных взаимодействий анти-N3PG антител по данному изобретению (201с и 201сYD) с белками плазмы. Антитело 201с, 201сYD или 201с НЗВ ковалентно связывают с шариками сефарозы и инкубируют с 10 мл нормальной человеческой плазмы в течение 2 ч при 37°C перед проведением колоночной хроматографии. Смесь гранулы/плазма упаковывали в колонки и промывали. Селективно связанные белки элюируются глицином (pH 2,5) в разных фракциях. Затем каждую фракцию анализируют на додецилсульфат натрия (SDS)-полиакриламидном геле с высоким разрешением (ПААГ) (от 4 до 16%). Серебряная окраска используется для визуализации белков и представляющие интерес полосы были вырезаны и проанализированы с помощью масс-спектрометрии. Параллельно анализируют множественные антитела контроля IgG1 человека.

Следуя процедурам, в основном, как описано выше, визуализация окрашенных серебром гелей продемонстрировала присутствие богатого гистидином гликопротеина (полоса ~ 64 кДа), альфа-цепи фибриногена (полоса ~ 60 кДа) и бета-цепи фибриногена (полоса ~ 50 кДа) во фракции-5 из элюции антитела 201с НЗВ по сравнению с антителами контрольного IgG1. Наоборот, антитела 201с и 201сYD не обладали заметной низкой аффинностью связывания с белками плазмы человека по сравнению с контрольным IgG и антителом 201с НЗВ.

Ex Vivo EpiScreen анализ пролиферации Т-клеток Ex vivo EpiScreen® анализ Т-клеток человека используется для измерения активации (пролиферация, секреция цитокинов) человеческих CD4+ Т-клеток в ответ на приведенное в качестве примера N3pGlu $A\beta$ антитело по данному изобретению (201с) или антитело 201с НЗВ. EpiScreen® использует образцы от 50 здоровых доноров, которые наилучшим образом представляют количество и частоту аллотипов HLA-DR и DQ, экспрессированных в популяциях Европы/Северной Америки и мира. В анализ включены два положительных контроля: гуманизированное A33, клиническое эталонное антитело, которое демонстрирует высокий уровень иммуногенности в клинике (73%) и обычно индуцирует 20-30% Т-клеточный ответ в анализе EpiScreen®, и KLH (гемоцианин лимфы улитки), митогеноподобный белок, содержащий неоантигены. Соответствующий буферный негативный контроль также включен в анализ.

Процент пролиферации Т-клеток рассчитывают по среднему значению всех положительных донорских ответов, наблюдаемых в течение периода времени (дни 5-8). Процент пролиферации Т-клеток составлял 20 и 94% для положительных контролей A33 и KLH соответственно, и составлял 24% для 201с НЗВ. Тем не менее, процент пролиферации Т-клеток составлял 10% для 201с. Эти данные демонстрируют, что антитело 201с имеет низкий уровень ответа Т-клеток по сравнению с положительными контролями и антителом 201с НЗВ.

Анализ иммуногенности in silico

EpiMatrix® анализ сканирует белковые последовательности для потенциальных эпитопов Т-клеток и использует алгоритм для прогнозирования иммуногенности. Он также учитывает содержание Tregitore и влияние на отрицательную регуляцию иммуногенного ответа. Аминокислотные последовательности антител 201с, 201сYD и B12L (антитело B12L содержит тяжелую цепь, которая обеспечивается по SEQ ID NO: 23 и легкую цепь, которая обеспечивается по SEQ ID NO: 24) были проанализированы с помощью EpiMatrix®. Прогнозируемые оценки EpiMatrix® приведены ниже в табл. 3.

Таблица 3. EpiMatrix® оценки

Антитело	EpiMatrix оценка белка	Tregitore- скорректированная EpiMatrix оценка белка	Прогнозируемый Т-зависимый ответ Ат
201с	39,14	-35,49	0,28 %
201сYD	24,76	-49,87	0,00 %
B12L	0,44	-17,92	4,03 %

Эти данные свидетельствуют о том, что предсказанный Т-клеточный-зависимый ответ антител ниже для антител N3pGlu Aβ по данному изобретению (201С и 201сYD) по сравнению с B12L антителом.

Отсутствие распознавания антител против лекарственного средства (ADA)

Для определения того, могут ли антитела против лекарственного средства, направленные против антитела LY3002813, связываться с 201с или 201сYD, проводится мостовой анализ с аффинным захватом элюции (ACE) с использованием биотина и рутения, меченных 201с, или биотина и рутения, меченных 201сYD.

В этом формате анализа ADA-мостик между двумя мечеными антителами (например, биотин и рутений, меченный 201с). Затем комплекс связывается с планшетом, покрытым стрептавидином (через антитело, меченное биотином), и для обнаружения используется рутений для генерации сигнала на платформе Mesoscale. Если ADA не распознает антитело 201с или 201сYD, сигнал не будет генерироваться. Кроличий античеловеческий IgG, скорее всего, связывается преимущественно сFc и используется в качестве положительного контроля, чтобы показать, что меченные 201с или 201сYD могут связывать антитела.

Антитела, направленные против LY3002813, включают аффинные антитела, очищенные из двух образцов пациентов из клинического испытания (IST-MC-AACC NCT01837641) после введения LY3002813. У этих пациентов развился ответ ADA на LY3002813 с течением времени, о чем свидетельствует положительный сигнал связывания в мостике ACE.

Следуя процедурам, по существу, как описано выше, при обнаружении связывания 201с или 201сYD с антителами против LY3002813 не наблюдалось никакого сигнала выше фонового. Эти данные демонстрируют, что ADA, направленная против LY3002813 у людей, не распознает 201с и 201сYD.

Последовательности

HCDR1 антитела 201с, антитела 201сYD и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 1)

AASGFTFSSYPMS

HCDR2 антитела 201с, антитела 201сYD и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 2)

AISGSGGSTYYADSVKG

HCDR3 антитела 201с и антитела 201сYD (SEQ ID NO: 3)

AREGGSGSYNGFDY

LCDR1 антитела 201с и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 4)

RASQSLGNWLA

LCDR1 антитела 201сYD (SEQ ID NO: 5)

RASQSLGNYLA

LCDR2 антитела 201с и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 6)

YQASTLES

LCDR2 антитела 201сYD (SEQ ID NO: 7)

YDASTLES

LCDR3 антитела 201с, антитела 201сYD и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 8)

QHYKGSFWT

HCVR антитела 201с и антитела 201сYD (SEQ ID NO: 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYN
GFDYWGGTLTVSS

LCVR антитела 201с и антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIK

LCVR антитела 201сYD (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIK

Тяжелая цепь антитела 201с и антитела 201сYD (SEQ ID NO: 12)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYN
GFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS

WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVD
 KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG

Легкая цепь антитела 201с и антитела 201с H3В (SEQ ID NO: 13)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLE
 SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь антитела 201сYD (SEQ ID NO: 14)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLE
 SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Иллюстративная ДНК для экспрессии тяжелой цепи антитела с SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 15)

gagggtcagctgttgagctctgggggagggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcacct
 tttagcagctatcctatgagctgggtccgccaggtccagggaagggtctggagtggtctcagctattagtgtagtggtgtag
 cacatactacgcagactccgtgaaggccggtaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacag
 cctgagagccgagggacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggtcagggaggtattataacggcttgattattgggg
 ccagggaaccctgggtaccgtctcctcagcctccaccaaggggccatcggtcttcccgtagcaccctcctccaagagcacctc
 tgggggacacggccctgggtcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtgggaactcagggccctg
 accagggcgtgcacacctcccggctgtctcactcaggtacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagc
 agctggggcaccagacacacatctgcaacgtgaatcaccaagccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagcccaaatc
 ttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctccttcccccaaaacc
 aaggacacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagt
 caactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgaggagagcagtaacacagcacgtaccgtgt
 ggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaagccctccag
 ccccatcgagaaaacctctccaaagccaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacccctgccccatccgggacg
 agctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatccagcagacatgccgtggagtgaggagagcaat

gggcagccggagaaacaactacaagaccacgcccccgctgggactccgacggctccttctctatatgaagctcacggtg
gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagag
cctctccctgtctccgggt

**Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела с SEQ ID NO: 13
(SEQ ID NO: 16)**

gacatccagatgaccaggtctcctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgcggggcagtcagagctt
tggttaactgggtggcctgggtatcagcagaaccagggaaagcccctaactcctgatctatcaggcgtctactttaaatctgggg
tcccatcaagattcagcggcaggtggatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgttttgaacttatt
actgccaaattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaacggaccgtggctgcacatctgtc
ttcatctcccgccatctgatgacaggttgaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatccagagagggcca
aagtacagtggaaggtgataacgccctccaatcgggtaactcccagagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagca
cctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatca
gggcctgagctcggcgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgctc

**Иллюстративная ДНК для экспрессии легкой цепи антитела с SEQ ID NO: 14
(SEQ ID NO: 17)**

gacatccagatgaccaggtctcctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgcggggcagtcagagctt
tggttaactatgtggcctgggtatcagcagaaccagggaaagcccctaactcctgatctatgatgcgtctactttaaatctgggg
cccatcaagattcagcggcaggtggatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgttttgaacttatta
ctgccaacattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaacggaccgtggctgcacatctgtct
tcatctcccgccatctgatgacaggttgaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatccagagagggcca
agtacagtggaaggtgataacgccctccaatcgggtaactcccagagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcac
ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcag
ggcctgagctcggcgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgctc

HCDR3 антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 18)

AREGGSGSYFNGFDY

HCVR антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGGSGSYFNG
FDYWGQGTLVTVSS

Тяжелая цепь антитела 201с H3B (SEQ ID NO: 20)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYFNG
FDYWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

**Иллюстративная ДНК для экспрессии тяжелой цепи антитела с SEQ ID NO: 20
(SEQ ID NO: 21)**

gagggtgcagctgttgagctctgggggagggctgtgacagcctgggggctcctgagactctcctgtgcagcctctggattcacct
ttagcagctatcctatgagctgggtccgagctccaggggaaggggctggagtggtgtcagctattagtggttagtggttag
cacatactacgcagactccgtgaaggcggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacag
cctgagagccgagacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggctcagggaggtattttaacgctttgattattggggc
cagggaaccctgggtcacctgtcctcagcctccaccaaggcccatcggtcttcccgtacgacccctcctccaagagcacctct
gggggacacagcggccctgggtgcctggtcaaggactactctcccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcagcgccctga
ccagcggtgtcacaccttcccgtgtcctacagctcctcagactactcctcagcagcgtgtggtgacctgacctcagca
gcttggggcaccagactacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaaggtggacaagaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggacgctcgtcttcttccccccaaaaccca
aggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgtgtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttc
aactggtacgtggagcggtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggagggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcaccgtcctgaccagagactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagccctccagc
ccccatcgagaaaacctctccaaaggcaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggacga
gctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatg
ggcagccgggagaacaactacaagaccacgccccccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcagggggaactgtctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagc
ctctcctgtctccgggt

N3pGlu Aβ (SEQ ID NO: 22)

[pE]FRHDSGYEVHHQKLFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Тяжелая цепь антитела B12L (SEQ ID NO: 23)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYDFTRYINWVRQAPQGLEWMGWIN
PGSGNTKYNEFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWG
QGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

Легкая цепь антитела B12L (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYCVQGTHYPFTFGQGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает человеческий N3pGlu Aβ (N3pGlu бета-амилоид), содержащее вариабельный участок легкой цепи (LCVR) и вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), в котором LCVR содержит LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 7, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и в котором HCVR содержит HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что LCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а LCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что LCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а LCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
4. Антитело по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что LCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 11, а HCVR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.
5. Антитело по п.4, содержащее LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.
6. Антитело по п.4, содержащее LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.
7. Антитело по любому из пп.1-6, содержащее легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14, и тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
8. Антитело по п.7, содержащее LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
9. Антитело по п.7, содержащее LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-9 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

