

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292230 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.17

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

(22) Дата подачи заявки
2018.04.16

(54) АНТИТЕЛА К БЕТА-АМИЛОИДНОМУ ПЕПТИДУ N3pGlu И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/487,550

(32) 2017.04.20

(33) US

(62) 201992163; 2018.04.16

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

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

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Христофоров
А.А., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В. (RU)

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

202292230

A1

A1

202292230

АНТИТЕЛА К БЕТА-АМИЛОИДНОМУ ПЕПТИДУ N3pGlu И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

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 осажденного 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

заклучалась в сокращении периода полураспада LY3002813. Следовательно, все еще остается потребность в альтернативных анти-N3pGlu Aβ антителах.

Антитела по данному изобретению стремятся обеспечить анти-N3pGlu Aβ антитела, которые связывают N3pGlu Aβ, бляшки (Aβ₁₋₄₂) *in vivo*, но которые также демонстрируют пониженную иммуногенность. Такие анти-N3pGlu Aβ антитела также могут продемонстрировать уменьшенное неспецифическое связывание с белками плазмы. Кроме того, такие анти-N3pGlu Aβ антитела могут также обеспечивать уменьшенный предсказанный Т-зависимый ответ опосредованный Ат. Такие анти-N3pGlu Aβ 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 Aβ, 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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ, причем указанное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, и вариабельный 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 Aβ, 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 Aβ, 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 Aβ, 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 Aβ, 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 Aβ, 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 НС представляет собой SEQ ID NO: 12. В более конкретном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу, содержащему две LC и две НС, где аминокислотная последовательность каждой LC представляет собой SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность каждой НС 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 Аβ, 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 Аβ, 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 Аβ, 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 функционального 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 A β 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 A β 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 A β 1-42 в спинномозговой жидкости (СМЖ) или бляшек A β 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 А β . 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 другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения при лечении состояния, выбранного из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения для замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностирована клиническая или доклиническая стадия болезни Альцгеймера, синдром Дауна или клиническая или доклиническая стадия церебральной амилоидной ангиопатии. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения с целью замедления когнитивных нарушений у пациента, у которого диагностирована продромальная AD, легкая AD, умеренная AD или тяжелая AD.

В данном изобретении также предложено антитело по данному изобретению для применения с целью снижения нагрузки А β амилоидной бляшки на головной мозг. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения при лечении

состояния, характеризующегося отложением A β у пациента, имеющего генетическую мутацию PSEN1 E280A. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения при лечении потери памяти или замедления когнитивных нарушений у пациента, имеющего генетическую мутацию PSEN1 E280A. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения для предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у пациента, имеющего генетическую мутацию PSEN1 E280A.

В данном изобретении также предложено антитело по данному изобретению для применения в профилактике состояния, выбранного из клинической или доклинической стадии AD, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии САА. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к антителу по данному изобретению для применения с целью профилактики состояния, выбранного из продромальной AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD.

Кроме того, данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению, для применения в терапии. В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, для применения при лечении заболевания, характеризующегося отложением A β .

Данное изобретение также относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, характеризующегося отложением A β . В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии. В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения продромальной AD, легкой AD, умеренной AD или тяжелой AD. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению

антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для замедления когнитивных нарушений у пациента с диагнозом состояния, выбранного из клинической или доклинической стадии болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии церебральной амилоидной ангиопатии. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для замедления когнитивных нарушений у пациента с диагнозом состояния, выбранного из продромальный AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD.

Данное изобретение также относится к применению антитела по данному изобретению в производстве лекарственного средства для снижения нагрузки A β амилоидной бляшки на головной мозг. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения состояния, характеризующегося отложением A β у пациента, имеющего генетическую мутацию PSEN1 E280A. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у пациента с генетической мутацией PSEN1 E280A. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для предотвращения потери памяти или замедления когнитивных нарушений у пациента. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, пациент имеет генетическую мутацию PSEN1 E280A. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для профилактики состояния, выбранного из клинической или доклинической стадии AD, синдрома Дауна и клинической или доклинической стадии САА. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к применению антитела по данному изобретению в изготовлении лекарственного средства для профилактики состояния, выбранного из продромальный AD, легкой AD, умеренной AD и тяжелой AD.

В одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В еще одном варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В другом варианте осуществления изобретения, данное изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В конкретном варианте осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, представляет собой SEQ ID NO: 15, и полинуклеотидная

последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, представляет собой SEQ ID NO: 16. В конкретном варианте осуществления изобретения, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, представляет собой SEQ ID NO: 15, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, представляет собой SEQ ID NO: 17, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, представляет собой SEQ ID NO: 16.

Кроме того, данное изобретение относится к клетке млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14. 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 другом варианте осуществления изобретения, 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: 14. В одном варианте осуществления изобретения, клеточная линия млекопитающих представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO) или эмбриональной почки китайского хомячка (HEK).

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, 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 вариабельный 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, внутривенным, 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 лечение» 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, характеризующееся 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 Aβ42 СМЖ или нагрузка отложений бляшки на головной мозг с помощью ПЭТ амилоида) указывают на самые ранние признаки у пациента с патологией Альцгеймера, прогрессирующий до клинической стадии болезни 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 Aβ, 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 A β антитела по данному изобретению, могут быть экспрессированны 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-метионинсульфоксимином (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 A β элюируют, например, цитратом натрия при pH (прибл.) 3,5 и фракции нейтрализуют 1 М трис-буфером. Фракции антитела N3pGlu A β обнаруживают, например, с помощью SDS-PAGE или аналитического исключения по размеру, а затем объединяют. N3pGlu A β антитело по данному изобретению, концентрируют в любом ФСБ буфере при pH 7,4 или 10 mM Na-цитратного буфера, 150 mM NaCl при pH около 6. Конечный материал может быть стерильно отфильтрован с использованием обычных методов. Чистота антитела N3pGlu A β составляет более чем 95 %. N3pGlu A β 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 A β .

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 A β антитела с пептидом pE3-42 A β измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore® 3000 (GE Healthcare). Авидность связывания измеряют путем иммобилизации около 120 RU пептида pE3-42 A β посредством аминного связывания на чипе Biacore® CM5 и протекания антитела N3pGlu A β , 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 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM 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 минут. 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 таблице 2).

Таблица 2. Кинетика и авидность связывания.

Антитело		k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
201c	Среднее	1,64E+03	6,98E-05	4,57E-08

	S. D.	3,88E+02	1,36E-05	2,06E-08
201cYD	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 201c. Антитело 201c H3B отличается на одну аминокислоту от антитела 201c, и это различие находится в HCDR3 тяжелой цепи (Туг в положении 10 в HCDR3 201c представляет собой Phe в 201c H3B). Антитело 201c 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 мкг/мл или 20 мкг/мл примера антитела N3pGlu A β по данному изобретению (201c или 201cYD). 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 201c H3B при экзогенной концентрации 20 мкг/мл. Эти гистологические исследования продемонстрировали, что приведенные в качестве примера антитела β N3pGlu 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 НЗВ в течение одного часа при 37 °С в 24-луночных планшетах. На обработку приходится четыре лунки. Первичные мышинные клетки микроглии (8×10^5 ; C57/BL6) затем добавляют и инкубируют в течение 24 часов. Ткань в каждой лунки 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 НЗВ 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 ТЕ). Соотношение ТЕ генерируется путем измерения относительной площади связанного антителом, и нормализации значения по отношению к общей относительной площади возможной цели (общее отложение А 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 ТЕ 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 А β ₁₋₄₂. Старые мыши PDAPP находятся на пределе бляшек, о чем свидетельствует незначительное дальнейшее накопление А β ₁₋₄₂ в течение 7-недельного периода лечения контрольным IgG. Группа химерных антител 201с и группа химерных антител 201с НЗВ демонстрируют значительное снижение А β 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 А β антитело 201с способно уменьшать бляшки (А β 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 часов при 37 °С перед проведением колоночной хроматографии. Смесь гранулы/плазма упаковывали в колонки и промывали. Селективно связанные белки элюируются глицином (рН 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 Aβ 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.

Анализе иммуногенности in silico

EpiMatrix[®] анализ сканирует белковые последовательности для потенциальных эпитопов Т-клеток и использует алгоритм для прогнозирования иммуногенности. Он также учитывает содержание Tregitope 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 Таблице 3.

Таблица 3. EpiMatrix[®] оценки.

Антитело	EpiMatrix оценка белка	Tregitope- 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 A β 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 анти-человеческий IgG, скорее всего, связывается преимущественно с Fc и используется в качестве положительного контроля, чтобы показать, что меченые 201с или 201сYD могут связывать антитела.

Антитела, направленные против LY3002813, включают аффинные антитела, очищенные из двух образцов пациентов из клинического испытания (I5T-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)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYN
GFDYWGQGTLVTVSS

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

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLE
SGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIK

LCVR антитела 201сYD (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLE
SGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIK

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

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYN
GFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

Легкая цепь антитела 201c и антитела 201c H3B (SEQ ID NO: 13)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

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

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

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

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacct
ttagcagctatcctatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggtctcagctattagtgtgtagtggtgtag
cacatactacgcagactccgtgaaggccggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacag
cctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggctcaggaggtattataacggcttgattattgggg
ccaggggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcccgtagcaccctcctccaagagcacctc
tgggggcacagcggccctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctg
accagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagc
agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaatc
ttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccc
aaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtt
caactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccag
ccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggacg
agctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggtctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaat

gggcagccggagaacaactacaagaccacgcccccgctgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtg
gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagag
cctctccctgtctccgggt

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

gacatccagatgaccagtccttccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggccagtcagagtct
tggttaactgggtggcctggatcagcagaaaccagggaaagcccctaaactcctgatctatcaggcgtctactttagaatctgggg
tcccatcaagattcagcggcagtgatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgatttgcaacttatt
actgccaacattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtc
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggcca
aagtacagtggaaagtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagca
cctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatca
gggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgc

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

gacatccagatgaccagtccttccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggccagtcagagtct
tggttaactatttggcctggatcagcagaaaccagggaaagcccctaaactcctgatctatgatgcgtctactttagaatctgggggt
cccatcaagattcagcggcagtgatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgatttgcaacttatta
ctgccaacattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtct
tcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggcca
agtacagtggaaagtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcac
ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag
ggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgc

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

AREGGSGSYFNGFDY

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYFNG
FDYWGQGT LVT VSS

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYFNG
FDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

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

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacct
ttagcagctatcctatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtgtag
cacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacag
cctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggctcaggaggtattttaacggctttgattattggggc
caggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccctcgttctccgctagcaccctcctccaagagcacctct
gggggacagcggccctgggctgcctgtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctga
ccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagca
gcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcttcttcccccaaaaccca
aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagc
ccccatcgagaaaaccatctccaaagcaaggagcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggacga
gctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgaggagagcaatg
ggcagccggagaaactacaagaccacgcccccgctggtgactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaacgttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
ctctccctgtctccgggt

N3pGlu A β (SEQ ID NO: 22)

[pE]FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Тяжелая цепь антитела B12L (SEQ ID NO: 23)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWIN
PGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

Легкая цепь антитела B12L (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAV
SKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 15.
3. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.
4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.3, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 16.
5. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.
6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что полинуклеотидная последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO:15 и полинуклеотидная последовательность, которая кодирует легкую цепь антитела, представляет собой SEQ ID NO:16.
7. Клетка млекопитающего, содержащая полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

8. Клетка млекопитающего по п.7, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

9. Клетка млекопитающего по п.7, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего способна экспрессировать тяжелую цепь антитела.

10. Клетка млекопитающего по п.7, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку яичников китайского хомячка (CHO) или клетку эмбриональной почки китайского хомячка (НЕК).

11. Клетка млекопитающего, содержащая полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

12. Клетка млекопитающего по п.11, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

13. Клетка млекопитающего по п.11, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего способна экспрессировать легкую цепь антитела.

14. Клетка млекопитающего по п.11, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку яичников китайского хомячка (CHO) или клетку эмбриональной почки китайского хомячка (НЕК).

15. Клетка млекопитающего, содержащая

i) полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и

ii) полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

16. Клетка млекопитающего по п.15, отличающаяся тем, что полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела, содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

17. Клетка млекопитающего по п.15, отличающаяся тем, что полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела, содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

18. Клетка млекопитающего по п.15, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего способна экспрессировать тяжелую цепь антитела и/или легкую цепь антитела.

19. Клетка млекопитающего по п.15, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку яичников китайского хомячка (CHO) или клетку эмбриональной почки китайского хомячка (HEK).

20. Способ получения анти-N3pG A β антитела, включающий:

- а) культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, для получения тяжелой цепи антитела и нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, для получения легкой цепи антитела в условиях, при которых антитело экспрессируется, и
- б) выделение антитела.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X21357	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2018/027718	International filing date (<i>day/month/year</i>) 16 April 2018 (16-04-2018)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 20 April 2017 (20-04-2017)
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.

☒

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3.

☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/027718

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 19-34, 38-49, 52-63, 65, 66
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/027718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 A61P25/28
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/021469 A1 (LILLY CO ELI [US]; LU JIRONG [US]; TANG YING [US]; DEMATTOS RONALD BRA) 16 February 2012 (2012-02-16) claims; example 3 -----	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
X	WO 2012/021475 A2 (LILLY CO ELI [US]; TANG YING [US]) 16 February 2012 (2012-02-16) claims 1-23 -----	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
X	WO 2016/043997 A1 (LILLY CO ELI [US]) 24 March 2016 (2016-03-24) claims 1-10 ----- -/-	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 2018

Date of mailing of the international search report

22/06/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lechner, Oskar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/027718

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEFFREY L CUMMINGS ET AL: "Alzheimer's 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	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
X,P	----- WO 2017/123517 A1 (LILLY CO ELI [US]) 20 July 2017 (2017-07-20) claims 1-28	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
X,P	----- WO 2018/005282 A1 (LILLY CO ELI [US]) 4 January 2018 (2018-01-04) claims; table 3	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
A	----- 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	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79
A	----- WO 2015/175769 A1 (BIOGEN MA INC [US]) 19 November 2015 (2015-11-19) par 48; SEQ ID Nos 7-10; claims 10-19 -----	1-18, 35-37, 50,51, 64,67-79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/027718

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012021469	A1	16-02-2012	
		AU 2011289629 A1	14-02-2013
		CA 2805114 A1	16-02-2012
		CL 2013000390 A1	21-03-2014
		CN 103068848 A	24-04-2013
		CN 105111308 A	02-12-2015
		CO 6670526 A2	15-05-2013
		CR 20130016 A	21-03-2013
		DK 2603523 T3	21-03-2016
		DK 3042917 T3	23-04-2018
		DO P2013000029 A	15-03-2013
		EA 201270813 A1	30-05-2013
		EC SP13012436 A	28-03-2013
		EP 2603523 A1	19-06-2013
		EP 3042917 A1	13-07-2016
		EP 3339323 A1	27-06-2018
		ES 2564252 T3	21-03-2016
		ES 2664128 T3	18-04-2018
		GT 201300036 A	16-07-2014
		HK 1180703 A1	15-07-2016
		HR P20160151 T1	11-03-2016
		HU E028678 T2	28-12-2016
		JP 5980207 B2	31-08-2016
		JP 2013536191 A	19-09-2013
		JP 2016179985 A	13-10-2016
		KR 20130051989 A	21-05-2013
		LT 3042917 T	10-05-2018
		MA 34461 B1	01-08-2013
		ME 02352 B	20-06-2016
		MX 342782 B	12-10-2016
		MY 163521 A	15-09-2017
		NZ 606095 A	28-11-2014
		NZ 626665 A	29-04-2016
		PE 08172013 A1	18-07-2013
		SG 187586 A1	28-03-2013
		SG 10201509330X A	30-12-2015
		SI 2603523 T1	29-04-2016
		SI 3042917 T1	30-04-2018
		UA 107600 C2	26-01-2015
		US 2013142806 A1	06-06-2013
		US 2014065138 A1	06-03-2014
		WO 2012021469 A1	16-02-2012
		ZA 201300437 B	25-06-2014
WO 2012021475	A2	16-02-2012	NONE
WO 2016043997	A1	24-03-2016	
		AR 101740 A1	11-01-2017
		AU 2015318257 A1	16-02-2017
		CA 2956835 A1	24-03-2016
		CL 2017000558 A1	10-11-2017
		CN 106687136 A	17-05-2017
		CR 20170080 A	30-03-2017
		DO P2017000071 A	15-06-2017
		EP 3193882 A1	26-07-2017
		JP 2017529348 A	05-10-2017
		KR 20170036103 A	31-03-2017
		NZ 728636 A	25-05-2018
		PE 04642017 A1	26-04-2017
		PH 12017500493 A1	07-08-2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/027718

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		SG 11201701330P A	27-04-2017	
		SV 2017005389 A	17-01-2018	
		TW 201618786 A	01-06-2016	
		US 2017224702 A1	10-08-2017	
		WO 2016043997 A1	24-03-2016	

WO 2017123517	A1	20-07-2017	AR 107290 A1	18-04-2018
			AU 2017207250 A1	07-06-2018
			TW 201739761 A	16-11-2017
			US 2017204171 A1	20-07-2017
			WO 2017123517 A1	20-07-2017

WO 2018005282	A1	04-01-2018	NONE	

WO 2015175769	A1	19-11-2015	NONE	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 19-34, 38-49, 52-63, 65, 66

The present application contains 79 claims, of which 53 are independent. There is no clear distinction between the independent claims because of overlapping scope. There are so many claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as it is particularly burdensome for a skilled person to establish the subject-matter for which protection is sought. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The search was based on the subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure, and the corresponding claims, namely the Ab according to claims 1-12 for use as a medicament e.g. in the treatment of Alzheimer's disease or other conditions characterized by deposition of amyloid beta.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.