

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293507** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

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

(22) Дата подачи заявки
2021.06.25

(54) **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ АКСОНАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С БЕТА-АМИЛОИДОМ 1-42**

(31) **63/043,872**

(32) **2020.06.25**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/067536**

(87) **WO 2021/260193 2021.12.30**

(71) Заявитель:
**МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB); ЭЛИ
ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Тан Кит (GB), Шеринг Крэйг, Симс
Джон Р., Дэйдж Джеффри Л. (US)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к предупреждению нейронального аксонального повреждения. Конкретнее, настоящее изобретение относится к предупреждению нейронального аксонального повреждения с использованием связывающих элементов, селективно связывающихся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 ($A\beta$ 1-42), где введение пациенту указанного связывающего элемента снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациентов.

A1

202293507

202293507

A1

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ АКСОНАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ
С БЕТА-АМИЛОИДОМ 1-42**

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к предупреждению нейронального аксонального повреждения. Конкретнее, настоящее изобретение относится к предупреждению нейронального аксонального повреждения с использованием связывающих элементов, селективно связывающихся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (A β 1-42), где введение пациенту указанных связывающих элементов снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациентов. Настоящее изобретение также относится к лечению болезни Альцгеймера.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется нарастающим когнитивным расстройством со снижением памяти, что препятствует социальной и профессиональной деятельности пациента. Это дегенеративное заболевание приводит к гибели нервных клеток в головном мозге, вызывающей когнитивные затруднения речи и высших функций, таких как критическое мышление, планирование, организация и логическое мышление, что может, в конечном счете, приводить к личностным изменениям. Конечные стадии заболевания характеризуются полной утратой способности к самостоятельной деятельности.

Преобладающими патологическими изменениями, ассоциированными с болезнью Альцгеймера (БА), в частности с нейрональным аксональным повреждением, ассоциированным с БА, являются бляшки во внеклеточном пространстве и внутринейронные нейрофибриллярные клубки белка тау, ассоциированного с микротрубочками.

Бляшки представляют собой агрегаты β -амилоидного пептида (A β), возникающего в результате аберрантного расщепления белка-предшественника амилоида (APP), трансмембранного белка, обнаруженного в нейронах и астроцитах головного мозга.

A β образуется из APP, последовательно расщепляемого секретазами с получением продуктов разной длины. Основным компонентом бляшек является изоформа A β 1-42 из 42 аминокислот, вовлеченная в образование нейротоксических олигомеров и образование бляшек в патогенезе БА. При БА в головном мозге преобладают несколько изоформ A β , включая A β 1-42, pGlu-A β 3-42, A β 3-42 и A β 4-42, из которых A β 1-42 и A β 4-42 являются основными формами в гиппокампе и коре при семейной и спорадической БА. A β , заканчивающийся остатком 42, является второстепенным компонентом среди разновидностей A β , образуемых при процессинге APP. Другие формы включают A β 1-40 и усеченные с N-конца A β n-40. Тем не менее, A β , заканчивающийся остатком 42, наиболее склонен к агрегации и способствует образованию амилоидных бляшек. Помимо большей склонности к агрегации, пептид A β 1-42 образует растворимые полимеры с малым числом n (или олигомеры), которые, как было показано, токсичны для нейронов в культуре. В отличие от более крупных видимых фибриллярных отложений, обычные патоморфологические анализы не позволяют выявлять олигомеры. Из образцов головного мозга, пораженного БА, были выделены олигомеры, обладающие сходными свойствами, и они ассоциированы с прогрессированием заболевания в большей степени, чем бляшки.

Основными моделями начала БА остаются гипотеза амилоидного каскада и сформулированная при ее дальнейшем развитии гипотеза олигомеров A β . Вследствие этого A β был основной мишенью для терапевтического вмешательства, при этом большинство экспериментальных лекарственных средств, изученных в клинических исследованиях за последние 20 лет, были направлены либо на уменьшение его образования (низкомолекулярными ингибиторами γ -секретазы и ингибиторами BACE), либо на стимулирование его выведения (иммунотерапевтическими методами). На данный момент ни один из этих способов не стал утвержденным болезнью-модифицирующим лечением БА.

Эти предложенные ранее способы были направлены как на A β 40-, так и на A β 42-формы пептида. A β 1-42 и A β 1-43 высоко гидрофобны и склонны к самоагрегации, в то время как у A β 1-40 эти свойства выражены меньше, и, фактически, он может быть антиамилоидогенным и оказывать нейропротективное действие в головном мозге. Кроме того, большинство мутаций пресенилина (PSEN1, каталитической субъединицы гамма-секретазного комплекса) не увеличивают общее количество образуемых A β , но, вместо этого, усиливают образование и увеличивают долю более длинных (менее

укороченных) амилоидогенных разновидностей А β (А β 42 и более). Помимо полноразмерного А β 1-42, при БА в головном мозге также распространены другие высоко амилоидогенные и нейротоксичные формы А β , включая варианты, усеченные с N-конца, такие как пироглутамат-модифицированный А β 3-42 (pGlu-А β 3-42), в случае которых антитела, направленные на N-конец, могут быть лишены реактивности. У некоторых N-концевых антител были также такие побочные эффекты, как микрокровоизлияния и вазогенный отек, возможно вследствие сочетания воздействия как на нерастворимые бляшки в веществе головного мозга, так и на отложения А β в сосудах и активной эффекторной функции.

БА представляет собой сложное многофакторное заболевание, и наряду с накоплением А β , оно включает множество наследственных, средовых, сосудистых, метаболических и воспалительных факторов. Известно, что бляшки А β могут начать появляться в головном мозге за десятки лет до постановки диагноза БА, и даже на самых ранних стадиях заболевания, сопровождающегося клиническими проявлениями, отложение А β почти достигает максимума и с большой долей вероятности уже присутствуют другие патологические изменения (то есть тау и нейровоспаление). Несмотря на это, огромный массив данных все еще указывает на ключевую роль нарушения гомеостаза А β в запуске БА, и патогенетические исследования позволяют связать несколько генов риска поздней БА с различными аспектами гомеостаза А β .

Таким образом, существует потребность в улучшенном лекарственном средстве для предупреждения нейронального аксонального повреждения, такого как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА. Настоящее изобретение позволяет решить одну или более чем одну из указанных выше задач.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к предупреждению нейронального аксонального повреждения с использованием связывающего элемента к человеческому бета-амилоидному пептиду 1-42 (А β 1-42), такого как антитело, селективно связывающееся с А β 1-42.

Ключевым аспектом настоящего изобретения является то, что предупреждение нейронального аксонального повреждения с использованием элемента, связывающегося с А β 1-42, снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения элемента, связывающегося с А β 1-42. Это было особенно неожиданным, поскольку ранее связи между направленным воздействием на

амилоид и снижением уровней NfL отмечено не было. Таким образом, селективное связывание с A β 1-42, снижение уровней NfL является новой областью терапии нейронального аксонального повреждения, включая нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА.

Авторы настоящего изобретения ранее описывали открытие, доклиническую и раннюю клиническую разработку полностью человеческого моноклонального антитела без эффекторной функции (MEDI1814), имеющего высокую аффинность и селективность в отношении полноразмерных и усеченных с N-конца форм A β 42/43 по сравнению с A β 40 (WO 2014/060444, полностью включенная сюда посредством ссылки). Авторы настоящего изобретения провели рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование у пациентов-людей с легкой или среднетяжелой БА с использованием данного антитела и продемонстрировали, что направленное воздействие на амилоид, в частности A β 1-42, с использованием связывающего элемента, селективно связывающегося с A β 1-42, снижает уровень NfL в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и плазме пациентов. Иными словами, авторы настоящего изобретения впервые продемонстрировали, что селективное связывание и секвестрация A β 1-42 предупреждают нейрональное аксональное повреждение, подтверждением чего является снижение NfL, и, таким образом, это потенциально применимо в лечении нейронального аксонального повреждения у пациентов с нейродегенеративными состояниями, такими как БА.

Настоящее изобретение обеспечивает существенные преимущества по сравнению с предшествующими вариантами A β -терапии как по потенциальной безопасности, так и по потенциальной эффективности, и при этом важно, что оно оказывает направленное воздействие только на ключевые токсичные компоненты A β (A β 1-42), не действуя на A β 1-40.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения болезни Альцгеймера (БА) у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (A β 1-42), пациенту, где связывающий элемент снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

Согласно изобретению также предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение терапевтически

эффективного количества связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 ($A\beta$ 1-42), пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения, где связывающий элемент снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

В указанных способах связывающий элемент может снижать уровень NfL в плазме пациента. В указанных способах связывающий элемент может снижать уровень NfL в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациента. Связывающий элемент может снижать уровень NfL по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения указанного связывающего элемента. Уровень NfL может быть измерен посредством ELISA (иммуоферментный анализ), возможно, SIMOA-HD1.

В указанных способах пациент может быть положителен по амилоиду, возможно, пациент: (а) отрицателен по тау; (б) отрицателен по нейродегенерации; (в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации; (г) положителен по тау; (д) положителен по нейродегенерации; (е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации; (ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или (з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации. Соответственно, способ может включать определение того, что пациент положителен по амилоиду, и возможно определение того, что пациент: (а) отрицателен по тау; (б) отрицателен по нейродегенерации; (в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации; (г) положителен по тау; (д) положителен по нейродегенерации; (е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации; (ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или (з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации. Статус пациента как (1) положительного или отрицательного по амилоиду, (2) положительного или отрицательного по тау и/или (3) положительного или отрицательного по нейродегенерации может быть определен независимо на основании: (а) ЦСЖ-маркера; (б) плазменного маркера; и/или (в) визуализационного маркера. В указанных способах: (а) (1) ЦСЖ-маркером амилоида может быть $A\beta$ 1-42 в ЦСЖ, (2) ЦСЖ-маркером тау может быть фосфо-тау в ЦСЖ, и/или (3) ЦСЖ-маркером нейродегенерации может быть общий тау в ЦСЖ; и/или (б) (1) визуализационным маркером амилоида может быть визуализация амилоида, (2) визуализационным маркером тау может быть визуализация

тау, и/или (3) визуализационным маркером нейродегенерации может быть магнитно-резонансная томография или позитронно-эмиссионная томография с фтордезоксиглюкозой.

Связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим A β 1-42, может представлять собой антитело. Указанное антитело, селективно связывающееся с человеческим A β 1-42, может связываться с A β 1-42 с константой диссоциации (K_D) 500 пМ или менее и либо не связывается с A β 1-40, либо связывается с A β 1-40 с K_D более 1 мМ.

Указанное антитело может содержать: (а) домен VH (вариабельной области тяжелой цепи), содержащий набор HCDR (гипервариабельный участок) MEDI1814, где аминокислотные последовательности HCDR Abet0380 представляют собой (1) HCDR1 SEQ ID NO:1, (2) HCDR2 SEQ ID NO:2 и (3) HCDR3 SEQ ID NO:3, или содержащий набор HCDR MEDI1814 с одной или двумя аминокислотными мутациями; и (б) домен VL (вариабельной области легкой цепи), содержащий набор LCDR MEDI1814, где аминокислотные последовательности LCDR MEDI1814 представляют собой (1) LCDR1 SEQ ID NO:4, (2) LCDR2 SEQ ID NO:5 и (3) LCDR3 SEQ ID NO:6, или содержащий набор LCDR MEDI1814 с одной или двумя аминокислотными мутациями.

Указанное антитело может содержать: (а) (1) аминокислотную последовательность домена VH MEDI1814 SEQ ID NO:9 или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями, и аминокислотную последовательность домена VL MEDI1814 SEQ ID NO:10 или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями; или (б) (1) аминокислотную последовательность домена VH Abet0380 SEQ ID NO:7, или ее вариант эмбрионального типа, или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями, и (2) аминокислотную последовательность домена VL Abet0380 SEQ ID NO:8, или ее вариант эмбрионального типа, или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями.

Указанное антитело может содержать домены VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0380-GL, депонированной под регистрационным номером 41890.

Указанное антитело может представлять собой человеческий IgG, возможно, человеческий IgG1 или человеческий IgG2. В частности, указанное антитело может представлять собой человеческий IgG1-TM, IgG1-YTE или IgG1-TM-YTE.

Указанное антитело можно вводить / может быть предназначено для введения в дозе 200 мг или более, возможно, где антитело вводят в дозе приблизительно 200 мг, более предпочтительно в дозе приблизительно 300 мг, еще более предпочтительно в дозе приблизительно 900 мг или еще более предпочтительно в дозе приблизительно 1800 мг.

Указанное антитело можно вводить / может быть предназначено для введения с интервалами от 3,5 до 4,5 недель; возможно, где антитело вводят с интервалами 4 недели (Q4W).

Связывающий элемент можно вводить / может быть предназначен для введения пациенту внутривенно или подкожно.

Нейрональное аксональное повреждение может быть ассоциировано с болезнью Альцгеймера (БА), возможно, БА в легкой или среднетяжелой форме, пресимптоматической стадией БА и/или легким когнитивным расстройством вследствие БА.

В указанных способах связывающий элемент может снижать уровень pTau217 у пациента по сравнению с уровнем pTau217 у пациента до введения связывающего элемента.

В указанных способах связывающий элемент может: (1) снижать уровень свободного A β 1-42 у пациента по сравнению с уровнем свободного A β 1-42 у пациента до введения связывающего элемента; и/или (2) повышать уровень общего A β 1-42 у пациента по сравнению с уровнем общего A β 1-42 у пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент может быть включен в состав фармацевтической композиции.

Согласно изобретению также предложен связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (A β 1-42) для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения, где связывающий элемент снижает

уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

Согласно изобретению также предложен способ оценки эффективности способа лечения болезни Альцгеймера, как определено здесь, или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, как определено здесь, включающий определение уровня NfL у пациента до введения связывающего элемента и после введения связывающего элемента, где способ предупреждения нейронального аксонального повреждения является эффективным, если уровень NfL у пациента после введения связывающего элемента снижен по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

Способ лечения болезни Альцгеймера или способ предупреждения нейронального аксонального повреждения можно расценивать как эффективный, если уровень NfL в плазме пациента снижен после введения связывающего элемента, возможно, где снижение уровня NfL в плазме представляет собой снижение по меньшей мере на 30%.

Способ лечения болезни Альцгеймера или способ предупреждения нейронального аксонального повреждения можно расценивать как эффективный, если уровень NfL в ЦСЖ пациента снижен после введения связывающего элемента, возможно, где снижение уровня NfL в ЦСЖ представляет собой снижение по меньшей мере на 30%.

Согласно изобретению также предложен способ определения того, что пациент является подходящим для способа лечения болезни Альцгеймера, как определено здесь, или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, как определено здесь, включающий оценку статуса пациента по амилоиду с применением ЦСЖ-маркера, плазменного маркера и/или визуализационного маркера до введения связывающего элемента, и где пациента определяют как подходящего для способа лечения болезни Альцгеймера или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, если статус пациента по амилоиду положителен.

Указанный способ скрининга может дополнительно включать оценку (1) статуса пациента по тау, (2) статуса пациента по нейродегенерации или (3) статуса пациента по тау и статуса пациента по нейродегенерации до введения связывающего элемента, где ЦСЖ-маркер и/или визуализационный маркер тау и/или нейродегенерации выбраны независимо, и где пациента определяют как подходящего для способа лечения болезни

Альцгеймера или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, если пациент: (а) отрицателен по тау; (б) отрицателен по нейродегенерации; (в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации; (г) положителен по тау; (д) положителен по нейродегенерации; (е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации; (ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или (з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации.

В указанном способе скрининга: (а) (1) ЦСЖ-маркером амилоида может быть Аβ1-42 в ЦСЖ, (2) ЦСЖ-маркером тау может быть фосфо-тау в ЦСЖ, и/или (3) ЦСЖ-маркером нейродегенерации может быть общий тау в ЦСЖ; и/или (б) (1) визуализационным маркером амилоида может быть визуализация амилоида, (2) визуализационным маркером тау может быть визуализация тау, и/или (3) визуализационным маркером нейродегенерации может быть магнитно-резонансная томография или позитронно-эмиссионная томография с фтордезоксиглюкозой.

Согласно изобретению также предложен набор, содержащий: (1) связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (Аβ1-42); и (2) антитело, специфично связывающееся с NfL; где, возможно, связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим Аβ1-42 представляет собой антитело, как определено здесь.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Диаграмма, на которой показано дозозависимое снижение свободного Аβ1-42 в ЦСЖ (верхняя диаграмма), повышение общего Аβ1-42 в ЦСЖ (средняя диаграмма) и отсутствие изменений общего Аβ1-40 в ЦСЖ (нижняя диаграмма) для когорт SAD и MAD. Показан % изменения в ЦСЖ на 29 суток (SAD) или 85 суток (MAD) после введения. При наличии исходных образцов и образцов после введения показаны все отдельные и медианные значения. Для SAD: объединенная группа плацебо для всего диапазона доз. Для MAD: объединенная группа плацебо для в/в и п/к введения. Количественный анализ Аβ проводили с применением иммунологических анализов на основе анализов MSD (Bogstedt *et al.*, *J. Alz. Disease*, 46, (2015), 1091). Серый символ — данные по свободному Аβ1-42 на нижней границе количественного определения (LLOQ) (SAD — 32 пг/мл; MAD — 12 пг/мл).

Фиг. 2. Диаграмма, на которой показано дозозависимое снижение NfL в ЦСЖ по результатам двух разных ELISA (верхняя и средняя диаграмма) и дозозависимое снижение NfL в плазме (нижняя диаграмма) для когорт MAD. Показан % изменения на

85 сутки (MAD) после введения. При наличии исходных образцов и образцов после введения показаны все отдельные и средние значения плюс/минус SE. Объединенная группа плацебо для в/в и п/к введения. Номинальные р-значения получены в модели ANCOVA на основе изменения относительно исходного значения (а не % изменения) с использованием вводимого препарата и схемы введения, исходного значения, возраста и пола в качестве ковариат после натуральной логарифмической трансформации результатов по биомаркеру.

Фиг. 3. Диаграмма, на которой показаны анализы корреляции между NfL в плазме и ЦСЖ, проведенные на нетрансформированных данных с применением метода Спирмана, а также с применением натуральной логарифмической трансформации данных и метода Пирсона. NfL в плазме против ЦСЖ, исходно: N равно 19, коэффициент Спирмана 0,4737 (р-значение менее 0,05) и коэффициент Пирсона 0,5336 (р-значение менее 0,05). NfL в плазме против ЦСЖ на 85 сутки после введения: N равно 20, коэффициент Спирмана 0,7414 (р-значение менее 0,05) и коэффициент Пирсона 0,6931 (р-значение менее 0,05). Корреляция в конечной точке не скорректирована по вводимому препарату и схеме введения.

Фиг. 4. Диаграмма, на которой показан % изменения $r\tau_{181}$ в ЦСЖ (верхняя диаграмма), $r\tau_{181}$ в плазме (средняя диаграмма) и $r\tau_{217}$ в плазме (нижняя диаграмма), % изменения определяли на 85 сутки после введения. При наличии исходных образцов и образцов после введения показаны все отдельные и средние значения плюс/минус SE. Объединенная группа плацебо для в/в и п/к введения.

Фиг. 5. Диаграмма, на которой показан % изменения $t\tau$ в ЦСЖ (верхняя диаграмма) и нейрогранина в ЦСЖ (нижняя диаграмма), % изменения определяли на 85 сутки после введения. При наличии исходных образцов и образцов после введения показаны все отдельные и средние значения плюс/минус SE. Объединенная группа плацебо для в/в и п/к введения. Серый символ — на уровне или ниже LLOQ на 85 сутки [τ (75 пг/мл); нейрогранин (125 пг/мл)].

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные здесь, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в области, к которой относится данное изобретение. Специалист в данной области может обнаружить многие из терминов, использованных в данном изобретении, в общих словарях Singleton, *et al.*,

DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994) и Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991).

Данное изобретение не ограничено типичными методами и материалами, раскрытыми здесь, и при практическом применении или испытании воплощений данного изобретения могут быть применены любые методы и материалы, сходные или эквивалентные методам и материалам, описанным здесь. Числовые диапазоны включают числа, которыми они определены. Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновых кислот написаны слева направо в 5'-3'-ориентации, аминокислотные последовательности написаны слева направо в N-C-ориентации, соответственно.

Заголовки, приведенные здесь, не являются ограничениями различных аспектов или воплощений данного изобретения.

Аминокислоты названы здесь с использованием названия аминокислоты, трехбуквенного сокращения или однобуквенного сокращения. При использовании здесь термин «белок» включает белки, полипептиды и пептиды. При использовании здесь термин «аминокислотная последовательность» синонимичен термину «полипептид» и/или термину «белок». В некоторых случаях термин «аминокислотная последовательность» синонимичен термину «пептид». Термины «белок» и «полипептид» использованы здесь взаимозаменяемо. В настоящем описании и формуле изобретения могут быть использованы традиционные однобуквенные и трехбуквенные коды аминокислотных остатков. 3-буквенный код аминокислот определен согласно Объединенной комиссии по биохимической номенклатуре (JCBN) IUPAC-IUB. Следует также понимать, что полипептид может быть кодирован более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

Другие определения терминов могут быть приведены по ходу описания. Перед более подробным описанием типичных воплощений следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными воплощениями, описанными здесь, и может, как таковое, варьировать. Также следует понимать, что термины, использованные здесь, предназначены лишь для описания конкретных воплощений и не являются ограничивающими, поскольку объем настоящего изобретения определен исключительно приложенной формулой изобретения.

Если контекстом ясно не указано иное, то там, где приведен диапазон значений, его следует понимать как конкретное указание каждого промежуточного значения, до

десятой доли единицы нижней границы, между верхней и нижней границами данного диапазона. Данное изобретение включает каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне. Верхняя и нижняя границы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и данное изобретение также включает каждый диапазон, где одна (ни одна) или обе границы (не) включены в такие меньшие диапазоны, в том числе, когда какая-либо граница прямо исключена из указанного диапазона. Там, где указанный диапазон включает одну или обе границы, данное изобретение также включает диапазоны, из которых исключены одна или обе из этих включенных границ.

При использовании здесь формы единственного могут быть использованы для обозначения одного или более чем одного (например, по меньшей мере одного) грамматического объекта указанной формы.

«Приблизительно» может обычно обозначать приемлемую степень ошибки измеренного количества с учетом характера или точности измерений. Типичные степени ошибки составляют не более 20 процентов (%), обычно не более 10% и чаще не более 5% данного значения или диапазона значений. Предпочтительно, термин «приблизительно» следует понимать здесь как плюс или минус (плюс/минус) 5%, предпочтительно плюс/минус 4%, плюс/минус 3%, плюс/минус 2%, плюс/минус 1%, плюс/минус 0,5%, плюс/минус 0,1% от числового значения величины, с которой он использован.

Воплощения, описанные здесь как «включающие» или «содержащие» один или более чем один признак, можно также рассматривать как описание соответствующих воплощений, «состоящих из» и/или «состоящих по существу из» таких признаков.

При использовании здесь термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регуляторным агентством федерального или регионального правительства или указанный в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, конкретнее, у людей.

Концентрации, количества, объемы, проценты и другие числовые значения могут быть представлены здесь в формате диапазона. Также следует понимать, что такой диапазонный формат применен исключительно для удобства и краткости, и его следует интерпретировать гибко, включая не только числовые значения, прямо указанные как границы диапазона, но также включая все отдельные числовые значения или

субдиапазоны, входящие в этот диапазон, так, как если бы каждое из этих числовых значений и субдиапазонов было указано в прямой форме.

Предполагается, что настоящее изобретение включает незначительные изменения аминокислотных последовательностей антител по изобретению, при условии, что эти изменения аминокислотной последовательности (аминокислотных последовательностей) позволяют ей (им) оставаться по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичной (идентичными) последовательности антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено здесь.

Антитела по изобретению могут включать варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующим остатком другого вида, в консервативных или неконсервативных положениях. В настоящем изобретении возможны получение и применение вариантов молекул антител, раскрытых здесь. Следуя примеру компьютерной химии в применении методик многофакторного анализа данных к связям структуры/свойств и активности [см., например, Wold, *et al.* Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski); D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)], количественные связи активности и свойств антител могут быть определены с применением хорошо известных математических методик, таких как статистическая регрессия, распознавание и классификация образов [см., например, Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828; Kandel, Abraham *et al.* Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847; Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089; Witten, Ian H. *et al.* Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525; Denison David G. T. (Editor) *et al.* Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369; Ghose, Arup K. *et al.* Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8]. Свойства антител могут быть определены в эмпирических и теоретических моделях (например, анализом вероятных контактных остатков или расчетных физико-

химических свойств) последовательности антитела, функциональных и трехмерных структур, и эти свойства можно рассматривать по-отдельности и в комбинации.

Аминокислотные остатки в неконсервативных положениях могут быть заменены консервативными или неконсервативными остатками. В частности, предполагаются консервативные аминокислотные замены.

«Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, где аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин или гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин или цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин или триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан или гистидин). Таким образом, если аминокислота полипептида заменена другой аминокислотой из того же семейства по боковой цепи, то такую аминокислотную замену рассматривают как консервативную. Включение консервативно модифицированных вариантов в антитело по изобретению не исключает других форм варианта, например, полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей.

«Неконсервативные аминокислотные замены» включают замены, где: (1) электроотрицательный остаток (например, Glu или Asp) заменен остатком, имеющим электроположительную боковую цепь (например, Arg, His или Lys), или наоборот; (2) гидрофобный остаток (например, Ala, Leu, Ile, Phe или Val) заменен гидрофильным остатком (например, Ser или Thr), или наоборот; (3) цистеин или пролин заменен любым другим остатком, или наоборот; или (4) остаток, имеющий меньшую боковую цепь (например, Ala или Ser) или не имеющий боковой цепи (например, Gly), заменен остатком, имеющим объемную гидрофобную или ароматическую боковую цепь (например, Val, His, Ile или Trp), или наоборот.

Типичное антитело содержит по меньшей мере две «легкие цепи» (LC) и две «тяжелые цепи» (HC). Легкие цепи и тяжелые цепи таких антител представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких доменов. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно «VH») и константную область

тяжелой цепи (сокращенно «СН»). Константная область тяжелой цепи содержит константные домены тяжелой цепи СН1, СН2 и СН3 (классы антител IgA, IgD и IgG) и, возможно, константный домен тяжелой цепи СН4 (классы антител IgE и IgM). Каждая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи (сокращенно «VL») и константный домен легкой цепи (сокращенно «CL»). Переменные области VH и VL можно разделить далее на гиперпеременные участки, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Константные домены» тяжелой цепи и легкой цепи не вовлечены непосредственно в связывание с антигеном, но демонстрируют различные эффекторные функции.

Связывание антитела с его антигеном- или эпитопом-мишенью опосредовано участками, определяющими комплементарность (CDR). CDR представляют собой участки с высокой переменностью последовательности, расположенные в переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела, где они формируют антигенсвязывающий сайт. CDR являются основными участками, определяющими специфичность в отношении антигена. Обычно каждая из тяжелой цепи и легкой цепи антитела содержит три CDR, которые расположены непоследовательно. CDR3-участки тяжелой и легкой цепи антитела играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антител по изобретению и поэтому обеспечивают еще один аспект изобретения.

Таким образом, при использовании здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает любую встречающуюся в природе или искусственно сконструированную конфигурацию антигенсвязывающего полипептида, содержащую один, два или три CDR легкой цепи и/или один, два или три CDR тяжелой цепи, где полипептид способен связываться с антигеном.

Последовательность CDR может быть определена по любой системе нумерации, известной в данной области, например, системе Kabat (Kabat, E. A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), системе Chothia (Chothia & Lesk, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196, 901–917 (1987)) или системе IMGT (Lefranc *et al.*, "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor

Variable Domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55–77 (2003)).

Для аминокислотных положений константной области тяжелой цепи, обсуждаемых в изобретении, нумерация соответствует нумерации EU, впервые описанной в Edelman, G.M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85. Нумерация EU по Edelman также изложена в Kabat *et al.* (1991) (выше). Таким образом, в контексте тяжелой цепи термины «нумерация EU, как изложено в Kabat», «нумерация EU» или «нумерация EU по Kabat» относятся к системе нумерации остатков, основанной на нумерации EU человеческого антитела IgG1 по Edelman *et al.*, как изложено в Kabat *et al.* (1991). Система нумерации, используемая для аминокислотной последовательности константной области легкой цепи также изложена в Kabat *et al.* (выше). Таким образом, при использовании здесь «нумерация по Kabat» относится к системе нумерации Kabat, как изложено в Kabat *et al.* (выше).

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно представляют собой моноклональные антитела. Более предпочтительно, антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой выделенные моноклональные антитела.

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены от любого вида рекомбинантными методами. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть мышинными, крысиными, козьими, лошадиными, свиными, бычьими, куриными, кроличьими, антителами представителей семейства Верблюдовых или их антигенсвязывающими фрагментами, ослиными, человеческими или их химерными вариантами. Для применения при введении людям антитела или антигенсвязывающие фрагменты, имеющие происхождение от источника, не являющегося человеком, могут быть генетически или структурно изменены, чтобы они были менее антигенными при введении пациенту-человеку.

Особенно предпочтительны человеческие или гуманизированные антитела, в особенности рекомбинантные человеческие или гуманизированные антитела. Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, где каркасные области или «участки, определяющие комплементарность» (CDR), модифицированы, чтобы содержать CDR иммуноглобулина, специфичность которого отличается от специфичности исходного иммуноглобулина. Например, мышиный CDR может быть перенесен на каркасную область человеческого антитела с получением

«гуманизированного антитела». См., например, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327, и Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. В некоторых воплощениях «гуманизированные антитела» представляют собой антитела, где константная область дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с константной областью исходного антитела с получением свойств антител по изобретению, в особенности применительно к связыванию с C1q и/или связыванию с Fc-рецепторами (FcR).

Антитела по изобретению могут представлять собой «антитела эмбрионального типа», в которых каркасные области представляют собой каркасные области последовательностей человеческих генных сегментов эмбрионального типа. Таким образом, каркасная область может представлять собой каркасную область эмбрионального типа, где один или более чем один остаток каркасной области изменен для соответствия остаткам в эквивалентных положениях наиболее сходной человеческой каркасной области эмбрионального типа. Специалист в данной области может выбрать сегмент эмбрионального типа, последовательность которого наиболее близка к последовательности каркасной области антитела до изменения, и проанализировать аффинность или активность антител для подтверждения того, что изменение не приводит к существенному снижению связывания с антигеном или активности (стандартные анализы известны в данной области). Последовательности человеческих генных сегментов эмбрионального типа известны специалистам в данной области и доступны, например, из собрания VBASE (VBASE, MRC Centre of Protein Engineering, UK, 1997, <http://mrc-35.cpe.cam.ac.uk>).

Термин «химерное антитело» относится к антителу, содержащему вариabельную область, то есть связывающую область, от одного источника или вида и по меньшей мере часть константной области, имеющую происхождение от другого источника или вида, обычно полученное методиками рекомбинантных ДНК. Предпочтительны химерные антитела, содержащие мышиную вариabельную область и человеческую константную область. Другие предпочтительные формы «химерных антител», включенные в настоящее изобретение, представляют собой антитела, где константная область модифицирована или изменена по сравнению с константной областью исходного антитела с получением свойств антител по изобретению, в особенности применительно к связыванию с C1q и/или связыванию с Fc-рецепторами (FcR). Такие химерные антитела также называют «антителами после переключения классов». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих

сегменты ДНК, кодирующие вариабельные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулинов. Способы получения химерных антител, включающие традиционные методики рекомбинантных ДНК и методики генной трансфекции, хорошо известны в данной области. См., например, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США №№ 5,202,238 и 5,204,244.

Термины «Fc-область», «Fc-часть» и «Fc» использованы здесь взаимозаменяемо и относятся к части нативного иммуноглобулина, образованной двумя Fc-цепями. Каждая «Fc-часть» содержит константный домен CH2 и константный домен CH3. Каждая Fc-часть может также содержать шарнирную область. Нативная Fc-область является гомодимерной. В некоторых воплощениях Fc-область может быть гетеродимерной, поскольку она может содержать модификации для усиления гетеродимеризации Fc.

Существует пять основных классов константных областей тяжелой цепи, классифицируемых как IgA, IgG, IgD, IgE и IgM, каждый из которых имеет эффекторные функции, характерные для соответствующего изотипа. Например, IgG делят на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекулы иммуноглобулинов взаимодействуют со многими классами клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fc γ -рецепторов (Fc γ R), специфичными в отношении антител класса IgG, а именно с Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Согласно сообщениям, последовательности, важные для связывания IgG с рецепторами Fc γ R, расположены в доменах CH2 и CH3.

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого изотипа, то есть IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулина (Ig). В предпочтительных воплощениях антитела против A β 1-42 или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты изотипа IgG. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты против A β 1-42 могут представлять собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого подкласса IgG, например, изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В предпочтительных воплощениях антитела против A β 1-42 или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты изотипа IgG1 или IgG2.

В некоторых воплощениях антитела против A β 1-42 содержат константную область тяжелой цепи изотипа IgG. В некоторых воплощениях антитела против A β 1-42 содержат часть константной области тяжелой цепи изотипа IgG. В некоторых воплощениях константная область IgG или ее часть представляет собой константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, константная область IgG или ее часть представляет собой константную область IgG1 или IgG2. Также возможны другие форматы молекул антител, например, IgG1 с мутациями YTE (Dall'Acqua *et al.* (2002) *J. Immunology*, 169: 5171- 5180; Dall'Acqua *et al.* (2006) *J Biol. Chem.* 281 (33):23514-24) и/или TM (Oganessian *et al.* (2008) *Acta Cryst D*64:700-4) в Fc-области.

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать легкую цепь лямбда или легкую цепь каппа.

В предпочтительных воплощениях антитела против A β 1-42 или их антигенсвязывающие фрагменты содержат легкую цепь, представляющую собой легкую цепь лямбда. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую константную область легкой цепи (CL), представляющую собой константную область лямбда.

В некоторых воплощениях антитело содержит легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL), представляющую собой переменную область лямбда. Предпочтительно, легкая цепь лямбда содержит VL, представляющую собой VL лямбда, и CL, представляющую собой CL лямбда.

Конструированные антитела против A β 1-42 и их антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты с модификациями каркасных остатков VH и/или VL. Такие модификации могут улучшать свойства антитела, например, снижать иммуногенность антитела и/или улучшать получение и очистку антитела.

Антитела против A β 1-42 и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые здесь, могут быть дополнительно модифицированы с применением обычных методик, известных в данной области, например, с применением аминокислотной (аминокислотных) делеции (делеций), вставки (вставок), замены (замен), присоединения (присоединений) и/или рекомбинации (рекомбинаций) и/или любой другой модификации (любых других модификаций), известных в данной области, самих по себе или в комбинации. Методы проведения таких модификаций последовательности ДНК,

лежащей в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту в данной области.

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител любого формата. В некоторых воплощениях антитело имеет «обычный» формат, описанный выше. Альтернативно, в некоторых воплощениях антитело может представлять собой Fab-фрагмент. Антитело по изобретению может также представлять собой Fab', Fv, scFv, Fd, домен VNAR, IgNAR, интртело, CH2 IgG, минитело, однодоменное антитело, Fcab, scFv-Fc, F(ab')₂, di-scFv, биспецифичную молекулу, связывающуюся с Т-клетками (BiTE®), F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, DVD-Ig, (scFv)₂ или mAb₂.

Термины «Fab-фрагмент» и «Fab» использованы здесь взаимозаменяемо и содержат одну легкую цепь (например, константный домен CL и VL) и одну тяжелую цепь (например, константный домен CH1 и VH). Тяжелая цепь Fab-фрагмента не может образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

«Fab'-фрагмент» содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, но, в дополнение к CH1 и VH, «Fab'-фрагмент» содержит область тяжелой цепи между доменами CH1 и CH2, необходимую для образования межцепочечной дисульфидной связи. Таким образом, возможна ассоциация двух «Fab'-фрагментов» посредством образования дисульфидной связи с получением молекулы F(ab')₂.

«F(ab')₂-фрагмент» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая цепь содержит часть константной области, необходимую для образования межцепочечной дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

«Fv-фрагмент» содержит только переменные области тяжелой и легкой цепи. Он не содержит константные области.

«Однодоменное антитело» представляет собой фрагмент антитела, содержащий часть, представленную одним доменом антитела (например, VH или VL).

«Одноцепочечный Fv» («scFv») представляет собой фрагмент антитела, содержащий домены VH и VL антитела, связанные друг с другом с образованием единой цепи. Для соединения доменов VH и VL scFv обычно используют полипептидный линкер.

«Тандемный scFv», также известный как TandAb®, представляет собой одноцепочечную Fv-молекулу, образованную ковалентным связыванием двух scFv в тандемной ориентации через гибкий пептидный линкер.

«Биспецифичная молекула, связывающаяся с Т-клетками» (BiTE®) представляет собой слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) на одной пептидной цепи. Один из scFv связывается с Т-клетками через рецептор CD3, а другой — с антигеном опухолевых клеток.

«Диатело» представляет собой малый бивалентный и биспецифичный фрагмент антитела, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) на одной и той же полипептидной цепи (VH-VL), соединенные пептидным линкером, малая длина которого не позволяет двум доменам одной цепи образовать пару друг с другом (Kirgizyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772). Это приводит к образованию пар из комплементарных доменов разных цепей и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антигенсвязывающими сайтами.

Более предпочтительно, антитела против A β 1-42 по изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой оголенные антитела. При использовании здесь термин «оголенное антитело» относится к антителу, не конъюгированному с терапевтическим агентом, например, с цитотоксическим агентом или радиоактивной меткой. В предпочтительных воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой оголенные моноспецифичные антитела.

Антитела против A β 1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты включают как интактные, так и модифицированные формы антител, раскрытых здесь. Например, антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть функционально связаны (например, химическим сочетанием, генетическим слиянием, нековалентным связыванием или иным образом) с одним или более чем одним молекулярным объектом, таким как фармацевтический агент, агент для выявления и/или белок или пептид, который может опосредовать связывание связывающей молекулы, раскрытой здесь, с другой молекулой (например, центральная область стрептавидина или полигистидиновая метка). Неограничивающие примеры агентов для выявления включают: ферменты, такие как щелочная фосфатаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа («G6PDH»), альфа-D-галактозидаза, глюкозооксидаза, глюкоамилаза, карбоангидраза,

ацетилхолинэстераза, лизоцим, малатдегидрогеназа и пероксидаза, например, пероксидаза хрена; красители; флуоресцентные метки или флуоресцентные вещества, такие как флуоресцеин и его производные, флуорохромы, соединения и производные родамина, GFP (GFP — «зеленый флуоресцентный белок» («Green Fluorescent Protein»)), дансил, умбеллиферон, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, *o*-фталевый альдегид и флуорескамин; флуорофоры, такие как криптаты и хелаты лантаноидов, например, европия и так далее (Perkin Elmer и Cis Bio International); хемилюминесцентные метки или хемилюминесцентные вещества, такие как изолюминол, люминол и диоксетаны; биолюминесцентные метки, такие как люцифераза и люциферин; сенсibilизаторы; коферменты; субстраты ферментов;

радиоактивные метки, включая, без ограничения, бром⁷⁷, углерод¹⁴, кобальт⁵⁷, фтор⁸, галлий⁶⁷, галлий⁶⁸, водород³ (тритий), индий¹¹¹, индий^{113m}, йод^{123m}, йод¹²⁵, йод¹²⁶, йод¹³¹, йод¹³³, ртуть²⁰⁷, ртуть²⁰³, фосфор³², рений^{99m}, рений¹⁰¹, рений¹⁰⁵, рутений⁹⁵, рутений⁹⁷, рутений¹⁰³, рутений¹⁰⁵, скандий⁴⁷, селен⁷⁵, серу³⁵, технеций⁹⁹, технеций^{99m}, теллур^{121m}, теллур^{122m}, теллур^{125m}, тулий¹⁶⁵, тулий¹⁶⁷, тулий¹⁶⁸ и иттрий¹⁹⁹; частицы, такие как частицы латекса или углерода, металлический золь, кристаллит, липосомы, клетки и так далее, которые могут быть дополнительно мечены красителем, катализатором или другой группой, поддающейся выявлению; такие молекулы, как биотин, дигоксигенин или 5-бромдезоксисуридин; токсинные группировки, такие как, например, токсинная группировка, выбранная из группы псевдомонадного экзотоксина (PE или его цитотоксического фрагмента или мутанта), дифтерийного токсина или его цитотоксического фрагмента или мутанта, ботулотоксина А, В, С, D, Е или F, рицина или его цитотоксического фрагмента, например, рицина А, абрина или его цитотоксического фрагмента, сапорина или его цитотоксического фрагмента, противовирусного токсина фитолакки или его цитотоксического фрагмента и бриодина-1 или его цитотоксического фрагмента.

Антитела против Аβ1-42 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты также включают производные, модифицированные (например, ковалентным присоединением молекулы любого типа к антителу) таким образом, что ковалентное присоединение не приводит к устранению связывания антитела с его эпитопом или иному снижению биологической активности антитела. Примеры подходящих производных включают, без ограничения, фукозилированные антитела,

гликозилированные антитела, ацетилированные антитела, пегилированные антитела, фосфорилированные антитела и амидированные антитела.

Другие воплощения представляют собой мультиспецифичные антитела (биспецифичные, триспецифичные и так далее) и другие конъюгаты, например, с цитотоксическими малыми молекулами. В другом предпочтительном воплощении антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой оголенные биспецифичные антитела.

Уровень определенной молекулы (конкретно, любого из биомаркеров, указанных здесь, например, NfL или A β 1-42), приведенный здесь, включает фактическое количество этой молекулы, такое как масса, молярное количество, концентрация или молярность молекулы. В контексте данного изобретения приведенный уровень определенной молекулы (например, NfL или A β 1-42) предпочтительно относится к концентрации этой молекулы.

Уровень молекулы может быть определен в любом подходящем физиологическом компартменте. Предпочтительные физиологические компартменты включают плазму, кровь и/или цереброспинальную жидкость (ЦСЖ). Уровень молекулы может быть определен в любом подходящем образце пациента, например, образце плазмы, образце крови, образце сыворотки и/или образце ЦСЖ. Другими неограничивающими примерами образцов, которые могут быть проанализированы, являются образцы тканей или жидкостей, образцы мочи и биоптаты. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, в изобретении может быть приведен уровень (например, концентрация) молекулы (например, NfL и/или A β 1-42) в плазме и/или ЦСЖ пациента. Уровень молекулы/биомаркера до введения связывающего элемента по изобретению может быть взаимозаменяемо назван «исходным уровнем».

Уровень молекулы (например, NfL и/или A β 1-42) после введения ингибитора A β 1-42 по изобретению может быть сопоставлен с уровнем молекулы у пациента до введения связывающего элемента. Таким образом, для изобретения обычно важен относительный уровень молекулы (например, NfL и/или A β 1-42) до и после введения. Уровень молекулы (например, NfL и/или A β 1-42) до введения может быть использован для определения того, что пациент является подходящим для лечения по изобретению.

Уровень молекулы может быть измерен непосредственно или косвенно и может быть определен с применением любой подходящей методики. Подходящие стандартные

методики, например, вестерн-блоттинг и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), известны в данной области.

Термины «бета-амилоидные пептиды» или «пептиды А β » или «А β » использованы взаимозаменяемо и относятся к пептидным фрагментам APP длиной от нескольких аминокислот до 43 аминокислот. Например, пептидные фрагменты могут иметь длину от 10 до 43 аминокислот. Эти пептиды образуются *in vivo* как продукты расщепления APP двумя протеазами, β -секретазой и γ -секретазой. Примеры включают А β 1-40 и А β 1-42.

Термин «А β 1-42» относится к основному компоненту бляшек, вовлеченному в образование нейротоксических олигомеров и бляшкообразование в патогенезе БА. Если не указано иное, термин «А β 1-42» может также включать ряд изоформ, заканчивающихся остатком 42 (А β _n-42), в том числе pGlu-А β 3-42, А β 3-42 и А β 4-42. Указание А β 1-42 включает мономерную форму, а также растворимые полимеры с малым числом n (или олигомеры). Типичной, но не ограничивающей аминокислотной последовательностью А β 1-42 является

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA

(SEQ ID NO:11).

Нейрофиламенты представляют собой компоненты цитоскелета нейронов, которые особенно многочисленны в аксонах. Их функции включают обеспечение структурной поддержки и поддержание размера, формы и диаметра аксонов (1). Нейрофиламенты принадлежат к семейству промежуточных филаментов, и их триплет содержит три субъединицы: легкую цепь нейрофиламентов (NF-L), среднюю цепь нейрофиламентов (NF-M) и тяжелую цепь нейрофиламентов (NF-H).

Термины «легкая цепь нейрофиламентов» или «NfL» использованы здесь взаимозаменяемо и относятся к наименьшим (приблизительно 68 кДа) из трех нейрофиламентов. Экспрессия NfL особенно высока в миелинизированных аксонах большого диаметра. Человеческую NfL кодирует ген NEFL. Типичной, но не ограничивающей аминокислотной последовательностью NfL является

MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAYSYSAPVSSSLSVRRS
 YSSSSGSLMPLENLDLSQVAAISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHELEQ
 QNKVLEAELLVLRQKHSEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLEE
 TLRNLQARYEEVLSREDAEGRLMEARKGADEAALARAELEKRIDSLMDEISFLKKV
 HEEEIAELQAQIQYAQISVEMDVTKPDLAALKDIRAQYEKLAAKNMQNAEEWFKS
 RFTVLTESAANKNTDAVRAAKDEVSESRLLKAKTLEIEACRGMNEALEKQLQELED
 KQNADISAMQDTINKLENELRRTTKSEMARYLKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLLEG
 EETRLSFTSVGSITSGYSQSSQVFGRSAYGGLQTSSYLMSTRSFPSYYTSHVQEE
 QIEVEETIEAAKAEAAKDEPPSEGEAEKEEKEEAEKEEAEKEEAEKEEAEKEE
 EEEGGEGEGEEETKEAEKEEKKVEGAGEEQAAKKKD

(SEQ ID NO:12).

Публикации, обсуждаемые здесь, приведены исключительно в силу их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто из приведенного здесь не следует трактовать как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники по отношению к приложенной формуле изобретения.

Связывающие элементы к Аβ1-42

Связывающий элемент к Аβ1-42 (взаимозаменяемо называемый здесь «элементом, связывающимся с Аβ1-42») относится к молекуле, которая селективно связывается с Аβ1-42 и, благодаря этому, может предупреждать накопление или приводить к обратному развитию отложений изоформ Аβ_n-42 (в частности Аβ1-42) в головном мозге и его сосудах. Таким образом, связывающий элемент к Аβ1-42 секвестрирует Аβ1-42.

Связывающий элемент по настоящему изобретению может предупреждать накопление или приводить к обратному развитию отложений Аβ1-42 в головном мозге и его сосудах. Связывающие элементы по настоящему изобретению могут связывать и осаждать растворимый Аβ1-42 в плазме крови и/или в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), снижая посредством этого концентрацию Аβ1-42 в сыворотке и/или ЦСЖ, соответственно. Это может представлять способ терапии болезни Альцгеймера и других состояний, ассоциированных с амилоидозом.

Элементы, связывающиеся с Аβ1-42, по изобретению селективны в отношении (также взаимозаменяемо названо здесь «специфичны в отношении») Аβ1-42. Элементы, связывающиеся с Аβ1-42, по изобретению могут связываться с растворимым мономерным человеческим Аβ1-42 и/или олигомерным Аβ1-42. Элементы, связывающиеся с Аβ1-42, по изобретению могут связываться с растворимым

мономерным человеческим 3-руго-42 (пироглутамат 3), 11-руго-42 (пироглутамат 11) и/или человеческим Аβ1-43. Элементы, связывающиеся с Аβ1-42, по изобретению могут обладать перекрестной реактивностью в отношении мышинового Аβ1-42.

Под селективностью понимают, что связывающий элемент связывается с Аβ1-42 без существенной перекрестной реактивности в отношении какой-либо другой молекулы, в частности Аβ1-40. Перекрестная реактивность может быть оценена любым подходящим методом. В качестве неограничивающего примера, перекрестную реактивность элемента, связывающегося с Аβ1-42, в отношении другой молекулы, отличной от Аβ1-42, можно рассматривать как существенную, если сила связывания связывающего элемента с этой другой молекулой составляет по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100% от силы его связывания с Аβ1-42. Сила связывания элемента, связывающегося с Аβ1-42, который селективно связывается с Аβ1-42, с другой молекулой, такой как Аβ1-40, может составлять менее 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20% от силы его связывания с Аβ1-42. Предпочтительно, сила связывания элемента, связывающегося с Аβ1-42, с другой молекулой составляет менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5%, менее 2% или менее 1% от силы его связывания с Аβ1-42.

Согласно изобретению может быть использован любой подходящий элемент, связывающийся с Аβ1-42, например, антитела, малые молекулы, пептиды, пептидомиметики и аптамеры. Предпочтительные связывающие элементы включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению может быть частью (входить в состав) фармацевтической композиции, предпочтительно вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем. Примеры подходящих фармацевтических композиций описаны в WO 2017031288, включенной сюда посредством ссылки. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» может быть использован здесь взаимозаменяемо с термином «эксципиент» или «разбавитель».

Антитела

Предпочтительно, связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим Аβ1-42, то есть элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано здесь.

Обычно антитело по изобретению связывается с Аβ1-42 с константой диссоциации (K_D) 600 пМ или менее, 500 пМ или менее, 400 пМ или менее или 300 пМ или менее. Предпочтительно, антитело по изобретению связывается с Аβ1-42 с K_D 500 пМ или менее. Обычно антитело по изобретению не связывается с Аβ1-40 или связывается с Аβ1-40 с K_D более 500 мкМ, более 750 мкМ, более 1 мМ или более 1,5 мМ. Предпочтительно, антитело по изобретению не связывается с Аβ1-40 или связывается с Аβ1-40 с K_D более 1 мМ. Особенно предпочтительны воплощения, где антитело по изобретению связывается с Аβ1-42 с K_D 500 p1 мМ или более.

Измерения K_D (аффинности связывания) могут быть проведены любым подходящим анализом, известным в данной области. Подходящие анализы включают анализ аффинности, проводимый с применением системы KinExA (например, KinExA 3100, KinExA 3200 или KinExA 4000) (Sapidyne Instruments, штат Айдахо) или системы Octet от ForteBio.

«Abet0380» представляет собой моноклональное антитело, связывающееся с человеческим Аβ1-42 с высокой аффинностью и специфичностью (то есть, оно селективно связывается с человеческим Аβ1-42). Abet0380 было описано авторами изобретения ранее в WO 2014/060444 (включенной сюда посредством ссылки). Последовательности VH и VL (а также последовательности CDR, подчеркнутые и выделенные полужирным шрифтом в последовательностях VH/VL) Abet0380, показаны в Таблице 1 ниже как SEQ ID NO:7 и 8, соответственно.

Таким образом, предпочтительный элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению представляет собой антитело, содержащее CDR тяжелой цепи (HCDR) Abet0380, как показано в Таблице 1 (SEQ ID NO:1-3), или их функциональный вариант, и CDR легкой цепи (LCDR) Abet0380, также показанные в Таблице 1 (SEQ ID NO:4-6), или их функциональный вариант.

«MEDI1814» представляет собой моноклональное антитело, связывающееся с человеческим Аβ1-42 с высокой аффинностью и специфичностью (то есть, оно селективно связывается с человеческим Аβ1-42). MEDI1814 было описано авторами изобретения ранее в WO 2014/060444 (включенной сюда посредством ссылки), где оно названо Abet0380 эмбрионального типа, Abet0380-GL. Последовательности VH и VL (а также последовательности CDR, подчеркнутые и выделенные полужирным шрифтом в последовательностях VH/VL) MEDI1814, показаны в Таблице 1 ниже как SEQ ID NO:9 и 10, соответственно.

Таким образом, предпочтительный элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению представляет собой антитело, содержащее: CDR тяжелой цепи (HCDR) Abet0380-GL/MEDI1814, как показано в Таблице 1 (SEQ ID NO:1-3), или их функциональный вариант; и CDR легкой цепи (LCDR) Abet0380/MEDI1814, также показанные в Таблице 1 (SEQ ID NO:4-6), или их функциональный вариант.

Предпочтительный элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению представляет собой антитело, содержащее: аминокислотную последовательность домена VH Abet0380 SEQ ID NO:7, или ее вариант эмбрионального типа, или ее функциональный вариант; и (б) аминокислотную последовательность домена VL Abet0380 SEQ ID NO:8, или ее вариант эмбрионального типа, или ее функциональный вариант.

Особенно предпочтительный элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению представляет собой антитело, содержащее: аминокислотную последовательность домена VH Abet0380-GL/MEDI1814 SEQ ID NO:9 или ее функциональный вариант; и (б) аминокислотную последовательность домена VL Abet0380-GL/MEDI1814 SEQ ID NO:10 или ее функциональный вариант.

Особенно предпочтительный элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению представляет собой антитело, содержащее домены VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0380-GL/MEDI1814, депонированной под регистрационным номером в NCIMB 41890 (депонированной в NCIMB, AB21 9YA, Великобритания, Шотландия, Абердин, Баксберн, Крейбстоун Истейт, Фергюсон Билдинг (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland, UK), 02 ноября 2011 г.).

Обычно антитело по изобретению представляет собой человеческий IgG, возможно, человеческий IgG1 или человеческий IgG2. Антитело может представлять собой человеческий IgG1-TM, IgG1-YTE или IgG1-TM-YTE.

Таблица 1: Информация о последовательностях антител Abet0380 и MEDI1814

HCDR1 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:1)	YQTMW
HCDR2 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:2)	VIGKTNENIAYADSVKG

HCDR3 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:3)	EWMDHSRPYYYYGMDV
LCDR1 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:4)	SGHNLEDKFAS
LCDR2 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:5)	RDDKRPS
LCDR3 Abet0380/MEDI1814 (SEQ ID NO:6)	SSQDTVTRV
VH Abet0380 (SEQ ID NO:7)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASMGNFNYQTMWW VRQAPGRGLEWWSVIGKTNENIAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWMDHSRPYYYYG MDVWGQGTTLTVSS
VL Abet0380 (SEQ ID NO:8)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHNLEDKFASWYQQK PGQSPVLVIYRDDKRPSGIPERFSASNSGHTATLTISGT QATDEADYYCSSQDTVTRVFGGGTKLTVL
VH MEDI1814 (VH Abet0380-GL) (SEQ ID NO:9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASMGNFNYQTMWW VRQAPGKGLEWWSVIGKTNENIAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWMDHSRPYYYYG MDVWGQGTTLTVSS
VL MEDI1814 (VL Abet0380-GL) (SEQ ID NO:10)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHNLEDKFASWYQQK PGQSPVLVIYRDDKRPSGIPERFSASNSGHTATLTISGT QAMDEADYYCSSQDTVTRVFGGGTKLTVL

Без ограничения теорией, поскольку MEDI1814 селективно связывается с Аβ1-42, полагают, что MEDI1814 (1) снижает свободный Аβ1-42 в ЦСЖ, не влияя на Аβ1-40, и (2) снижает уровень NfL как в плазме, так и в ЦСЖ, предупреждая нейрональное аксональное повреждение (такое как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА). Известно, что аксональное повреждение является

нейропатологическим фактором при БА, и известно, что оно ассоциировано с повышенными уровнями NfL. Таким образом, снижение уровней NfL обладает терапевтическим потенциалом при лечении и/или предупреждении нейронального аксонального повреждения, такого как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА.

Настоящее изобретение включает антитела, определенные здесь, имеющие указанные последовательности CDR или переменные последовательности тяжелой и легкой цепи (эталонные антитела (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380)), а также их функциональные варианты. «Функциональный вариант» связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380). Аффинность функциональных вариантов в отношении антигена-мишени может отличаться от соответствующей аффинности эталонного антитела, но предпочтительна по существу такая же аффинность.

Функциональные варианты эталонного антитела (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380) демонстрируют переменность последовательности в одном или более чем одном CDR по сравнению с последовательностями соответствующих эталонных CDR. Таким образом, функциональный вариант антитела может содержать функциональный вариант CDR. Там, где термин «функциональный вариант» использован в контексте последовательности CDR, это означает, что CDR имеет не более 2 аминокислотных отличий, предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с последовательностью соответствующего эталонного CDR и в комбинации с 5 остальными CDR (или их вариантами) позволяет варианту антитела связываться с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), и, предпочтительно, демонстрировать такую же аффинность в отношении антигена-мишени, что и эталонное антитело (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380).

Например, вариант эталонного антитела (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380) может содержать:

CDR1 тяжелой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:1;

CDR2 тяжелой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:2;

CDR3 тяжелой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:3;

CDR1 легкой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:4;

CDR2 легкой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:5; и

CDR3 легкой цепи, имеющий не более 2 аминокислотных отличий при сравнении с SEQ ID NO:6;

где вариант антитела связывается с мишенью MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 (например, A β 1-42), предпочтительно с такой же аффинностью.

Предпочтительно, вариант эталонного антитела (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380) может содержать:

CDR1 тяжелой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:1;

CDR2 тяжелой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:2;

CDR3 тяжелой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:3;

CDR1 легкой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:4;

CDR2 легкой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:5; и

CDR3 легкой цепи, имеющий не более 1 аминокислотного отличия при сравнении с SEQ ID NO:6;

где вариант антитела связывается с мишенью MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 (например, A β 1-42), предпочтительно с такой же аффинностью.

Вариант антитела может иметь в общей сложности не более 5, 4 или 3 аминокислотных отличий в своих CDR при сравнении с соответствующим эталонным антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждый отдельный CDR имеет не более 2 аминокислотных отличий (предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия). Предпочтительно, вариант антитела имеет в общей сложности не более 2 аминокислотных отличий (более предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия) в своих CDR при сравнении с соответствующим эталонным

антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждый отдельный CDR имеет не более 2 аминокислотных отличий. Более предпочтительно, вариант антитела имеет в общей сложности не более 2 аминокислотных отличий (более предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия) в своих CDR при сравнении с соответствующим эталонным антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждый отдельный CDR имеет не более 1 аминокислотного отличия.

Аминокислотное отличие может представлять собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В одном воплощении аминокислотное отличие представляет собой консервативную аминокислотную замену, как описано здесь.

Вариант антитела может иметь в общей сложности не более 5, 4 или 3 аминокислотных отличий в своих каркасных областях при сравнении с соответствующим эталонным антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждая отдельная каркасная область имеет не более 2 аминокислотных отличий (предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия). Предпочтительно, вариант антитела имеет в общей сложности не более 2 аминокислотных отличий (более предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия) в своих каркасных областях при сравнении с соответствующим эталонным антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждая отдельная каркасная область имеет не более 2 аминокислотных отличий. Более предпочтительно, вариант антитела имеет в общей сложности не более 2 аминокислотных отличий (более предпочтительно не более 1 аминокислотного отличия) в своих каркасных областях при сравнении с соответствующим эталонным антителом (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), при условии, что каждая отдельная каркасная область имеет не более 1 аминокислотного отличия.

Таким образом, вариант антитела может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано здесь, где:

тяжелая цепь имеет не более 14 аминокислотных отличий (не более 2 аминокислотных отличий в каждом CDR и не более 2 аминокислотных отличий в каждой каркасной области) при сравнении с последовательностью тяжелой цепи, приведенной здесь; и

легкая цепь имеет не более 14 аминокислотных отличий (не более 2 аминокислотных отличий в каждом CDR и не более 2 аминокислотных отличий в каждой

каркасной области) при сравнении с последовательностью легкой цепи, приведенной здесь;

где вариант антитела связывается с тем же антигеном-мишенью ($A\beta 1-42$), что и эталонное антитело (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), предпочтительно с такой же аффинностью.

Тяжелые или легкие цепи варианта могут быть названы «функциональными эквивалентами» эталонных тяжелых или легких цепей.

В одном воплощении вариант антитела может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано здесь, где:

тяжелая цепь имеет не более 7 аминокислотных отличий (не более 1 аминокислотного отличия в каждом CDR и не более 1 аминокислотного отличия в каждой каркасной области) при сравнении с последовательностью тяжелой цепи, приведенной здесь; и

легкая цепь имеет не более 7 аминокислотных отличий (не более 1 аминокислотного отличия в каждом CDR и не более 1 аминокислотного отличия в каждой каркасной области) при сравнении с последовательностью легкой цепи, приведенной здесь;

где вариант антитела связывается с тем же антигеном-мишенью ($A\beta 1-42$), что и эталонное антитело (например, MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380), предпочтительно с такой же аффинностью.

Авторы изобретения также продемонстрировали особенно предпочтительные дозы / схемы введения элемента, связывающегося с $A\beta 1-42$, для предупреждения нейронального аксонального повреждения, в частности где элемент, связывающийся с $A\beta 1-42$, представляет собой антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814 или его функциональный вариант. Было продемонстрировано, что предпочтительные диапазоны доз приводят к снижению уровня NfL (и свободного $A\beta 1-42$, и, возможно, нейрогранина (Ng)), уменьшая в то же время риск побочных эффектов, ассоциированных с традиционным лечением амилоидоза, ARIA или влияния на уровень других биомаркеров, таких как $A\beta 1-40$, pTau₁₈₁ и tTau.

Например, было показано, что доза 200 мг или более (обычно вводимая с интервалами один месяц или 4 недели) эффективно снижала NfL и свободный $A\beta 1-42$.

Элемент, связывающийся с $A\beta 1-42$, по изобретению, в частности антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его

функциональный вариант, можно вводить в дозе 200 мг или более, такой как 200-2000 мг, предпочтительно 300-2000 мг, более предпочтительно 300-1800 мг.

Если контекстом ясно не продиктовано иное, то там, где приведен диапазон значений, его следует понимать как конкретное указание каждого промежуточного значения, до десятой доли единицы, между верхней и нижней границами данного диапазона. Данное изобретение включает каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне. Также следует понимать, что любой диапазон числовых значений, заданный здесь выражением «от а до b» обозначает диапазон числовых значений протяженностью от а до b (то есть включающий строго заданные конечные точки а и b).

«Доза» предпочтительно определена в миллиграммах элемента, связывающегося с Аβ1-42, в частности антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (то есть в миллиграммах связывающего элемента / антитела, вводимого пациенту в указанной дозе). Таким образом, в качестве неограничивающего примера, указание «дозы 300 мг антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта» означает, что при введении указанной дозы пациенту вводят 300 мг антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта. При использовании фармацевтической композиции, содержащей связывающий элемент, в частности антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант (возможно, вместе с эксципиентами), доза относится к вводимому количеству компонента, представленного связывающим элементом по изобретению, в частности антителом по изобретению, предпочтительно антителом MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональным вариантом (например, к миллиграммам вводимого связывающего элемента / антитела).

Подходящая доза может составлять приблизительно 200 мг. Таким образом, антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить в дозе приблизительно 200 мг.

Подходящая доза может составлять приблизительно 300 мг. Таким образом, антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или

Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить в дозе приблизительно 300 мг.

Подходящая доза может составлять приблизительно 900 мг. Таким образом, антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить в дозе приблизительно 900 мг.

Подходящая доза может составлять приблизительно 1800 мг. Таким образом, антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить в дозе приблизительно 1800 мг.

Кроме того, антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить с определенными временными интервалами.

Обычно антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, вводят с частотой один раз в 3,5-4,5 недели. Например, антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить один раз в 3,5, 4 или 4,5 недели. Предпочтительно, антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, вводят с частотой один раз в 4 недели (Q4W).

С учетом определенных (заданных) доз и временных интервалов, указанных выше, особенно предпочтительные терапевтические схемы по изобретению могут представлять собой следующее.

Например, согласно изобретению, предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, в дозе приблизительно 200 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению,

в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Иными словами, согласно изобретению, предложено антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение указанного антитела в дозе приблизительно 200 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Например, согласно изобретению, предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, в дозе приблизительно 300 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Иными словами, согласно изобретению, предложено антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение указанного антитела в дозе приблизительно 300 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Например, согласно изобретению, предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, в дозе приблизительно 900 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Иными словами, согласно изобретению, предложено антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение указанного антитела в дозе приблизительно 900 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Например, согласно изобретению, предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его

функционального варианта, в дозе приблизительно 1800 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Иными словами, согласно изобретению, предложено антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение указанного антитела в дозе приблизительно 1800 мг и с интервалами 4 недели (Q4W) пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, селективно связывается с человеческим A β 1-42 и снижает уровень NfL (в частности NfL в плазме) у пациента относительно уровня NfL (в частности NfL в плазме) у пациента до введения антитела по изобретению, в частности антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта (например, относительно исходного уровня).

Введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению, в частности антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, на протяжении определенных (например, минимальных) периодов времени может обеспечить дополнительные преимущества. Например, введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению, в частности антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, на протяжении по меньшей мере 8 недель, предпочтительно по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 16 недель, может позволить схеме введения обеспечить максимальную биодоступность связывающегося элемента и/или максимальное лечение (например, подавление) заболевания. В предпочтительных воплощениях элемент, связывающийся с A β 1-42, по изобретению, в частности антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL

или Abet0380 или его функциональный вариант, вводят пациенту, нуждающемуся в этом, в качестве долгосрочного лечения, такого как лечение на протяжении всей жизни пациента, с любым интервалом введения, описанным здесь, при этом особенно предпочтительно введение один раз в 4 недели или один раз в месяц.

Элемент, связывающийся с A β 1-42, по изобретению, в частности антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить на протяжении по меньшей мере приблизительно 8 недель. Например, элемент, связывающийся с A β 1-42, можно вводить на протяжении по меньшей мере приблизительно 12, 16, 20, 24, 28 или 32 недель или более в качестве долгосрочного лечения, предпочтительно на протяжении всей жизни пациента.

Элемент, связывающийся с A β 1-42, по изобретению, в частности антитело по изобретению, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант, можно вводить на протяжении 8-52 недель, например, 12-48 недель, 16-44 недель, 20-40 недель, или 24-36 недель, или более в качестве долгосрочного лечения, предпочтительно на протяжении всей жизни пациента.

Без ограничения теорией, полагают, что введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению, в частности антитела по изобретению, предпочтительно антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта, пациенту приводит к снижению NfL и свободного A β 1-42 у пациента и ассоциированному с этим уменьшению нейронального аксонального повреждения и, возможно, к ассоциированному с этим уменьшению образования бляшек.

Во избежание сомнений, все, что раскрыто здесь применительно к антителу по изобретению (например, антителу MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональному варианту) также в равной степени применимо к другим элементам, связывающимся с A β 1-42, по изобретению, как описано здесь. В качестве неограничивающего примера, доза, интервалы введения и/или продолжительность введения, раскрытые здесь в контексте антитела по изобретению (например, антитела MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функционального варианта) также в равной степени применимо к другим элементам, связывающимся с A β 1-42, по изобретению.

Малые молекулы

В качестве элементов, связывающихся с Аβ1-42, как описано здесь, могут быть использованы малые молекулы. Как определено здесь, малые молекулы представляют собой соединения, обычно органические соединения, с малой молекулярной массой. Обычно максимальная молекулярная масса малой молекулы составляет 900 Да, что позволяет ей быстро диффундировать через клеточные мембраны. В некоторых воплощениях максимальная молекулярная масса малой молекулы составляет 500 Да. Обычно малая молекула имеет размер порядка 1 нм.

В данной области известны стандартные методики получения малых молекул, которые могут затем быть легко проанализированы на предмет активности связывания с Аβ1-42, как описано здесь.

Аптамеры

Аптамеры обычно представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, связывающиеся с определенной молекулой-мишенью. Аптамеры могут быть полностью сконструированы *in vitro*, и их легко получить химическим синтезом, они обладают желаемыми свойствами при хранении и приводят к незначительной иммуногенности или неиммуногенны при их терапевтическом применении. Эти характеристики делают их особенно полезными при их использовании в фармацевтических и терапевтических целях.

При использовании здесь «аптамер» относится, в целом, к одно- или двуцепочечному олигонуклеотиду или к смеси таких олигонуклеотидов, где олигонуклеотид или смесь способны специфично связываться с мишенью. Здесь будут обсуждаться олигонуклеотидные аптамеры, но специалисту в данной области будет ясно, что могут также быть использованы другие аптамеры, обладающие эквивалентными характеристиками связывания, такие как пептидные аптамеры.

В целом, аптамеры могут включать олигонуклеотиды длиной по меньшей мере 5, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 нуклеотидов. Аптамеры могут включать последовательности длиной до 40, до 60 или до 100 нуклеотидов или более. Например, длина аптамеров может составлять от 5 до 100 нуклеотидов, от 10 до 40 нуклеотидов или от 15 до 40 нуклеотидов. По возможности, предпочтительны аптамеры меньшей длины, поскольку это будет обычно уменьшать влияние со стороны других молекул или веществ.

Аптамеры могут быть получены рутинными методами, такими как методика систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)). SELEX представляет собой метод *in vitro* эволюции молекул нуклеиновых кислот, обладающих высокой специфичностью связывания с молекулами-мишенями. Он описан, например, в US 5,654, 151, US 5,503,978, US 5,567,588 и WO 96/38579.

Метод SELEX включает отбор аптамеров из нуклеиновых кислот, и в частности одноцепочечных нуклеиновых кислот, способных связываться с желаемой мишенью, из коллекции олигонуклеотидов. Коллекцию одноцепочечных нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК или их вариантов) приводят в контакт с мишенью в условиях, благоприятных для связывания, нуклеиновые кислоты, связанные с мишенями в смеси, отделяют от несвязанных нуклеиновых кислот, проводят диссоциацию комплексов нуклеиновых кислот и мишеней, нуклеиновые кислоты, связывавшиеся с мишенью, амплифицируют с получением коллекции или библиотеки, обогащенной нуклеиновыми кислотами, имеющими желаемую активность, и затем эту серию стадий повторяют столько, сколько необходимо для получения библиотеки нуклеиновых кислот (аптамеров), обладающих определенной аффинностью связывания с соответствующей мишенью.

Пептидомиметики

Пептидомиметики представляют собой соединения, имитирующие естественный пептид или белок, способные взаимодействовать с биологической мишенью и оказывать такой же биологический эффект. Пептидомиметики могут обладать преимуществами по сравнению с пептидами с учетом стабильности и биодоступности естественного пептида. Пептидомиметики могут иметь модификации основной или боковой цепи исходного пептида, разработанного для выполнения биологической функции. Примеры классов пептидомиметиков включают, без ограничения, пептоиды и β -пептиды, а также пептиды, содержащие D-аминокислоты.

Снижение легкой цепи нейрофиламентов (NfL)

Ключевое значение для настоящего изобретения имеет то, что введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению снижает уровень NfL у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающегося элемента. Как описано здесь, NfL является компонентом аксоскелета нейронов, и ее высвобождение в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и/или плазму является биомаркером

нейронального аксонального повреждения. Поэтому введение элемента, связывающегося с Аβ1-42, по изобретению может найти терапевтическое применение в предупреждении и/или посредством предупреждения нейронального аксонального повреждения, такого как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА, а также нейронального аксонального повреждения, ассоциированного с другими нейродегенеративными заболеваниями или расстройствами, и/или других состояний, ассоциированных с амилоидозом, приводящих к нейрональному аксональному повреждению. Таким образом, применение элементов, связывающихся с Аβ1-42, по изобретению представляет новый способ терапии нейронального аксонального повреждения.

Элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению может снижать уровень NfL в (1) плазме, (2) ЦСЖ или (3) плазме и ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента. Предпочтительно, элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению снижает уровень NfL как в плазме, так и в ЦСЖ.

Уровень NfL в плазме пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация NfL в плазме повышен/повышена по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста (Mattsson *et al.* (2017) JAMA Neurol. 74:557-566, включено сюда посредством ссылки). Повышение NfL пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Типичные уровни у субъектов с БА составляют, в среднем, 51,0 пг/мл при большом стандартном отклонении, составляющем 26,9 пг/мл, и могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа образцов. Чем больше повышение NfL в плазме до введения связывающего элемента, тем больше возможность ее снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня NfL в плазме пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня NfL в плазме пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень NfL, такой как уровень NfL в плазме, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по

меньшей мере на 50% по сравнению с уровнем NfL (например, в плазме) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

Уровень NfL в ЦСЖ пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация NfL в ЦСЖ повышен/повышена по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста. Повышение NfL пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Обычно концентрация NfL в ЦСЖ пациента до лечения составляет 1 нг/мл или более, 800 пг/мл или более, 600 пг/мл или более или 500 пг/мл или более. Предпочтительно, концентрация NfL в ЦСЖ пациента до лечения составляет 600 пг/мл или более. Типичные уровни NfL в ЦСЖ субъектов с БА могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа образцов. Чем больше повышение NfL в ЦСЖ до введения связывающего элемента, тем больше возможность ее снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня NfL в ЦСЖ пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня NfL в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень NfL, такой как уровень NfL в ЦСЖ, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнем NfL (например, в ЦСЖ) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

Уровень NfL может быть определен с применением любого подходящего метода, традиционные методики известны в данной области. В качестве неограничивающего примера, уровень NfL может быть определен с применением *in vitro* анализов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия, иммунопреципитация, аффинная хроматография и биохимические или клеточные анализы. Уровень NfL может также быть измерен непосредственно, например, в плазме или ЦСЖ, с использованием связывающего элемента (например, антитела, специфичного в отношении NfL) в биосенсорной системе, где связывающий элемент мечен реагентом для выявления, как описано здесь. Предпочтительно, уровень NfL (в частности, уровень NfL в плазме и/или ЦСЖ) определяют с применением ELISA, более предпочтительно SIMOA-HD1.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень NfL (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

В качестве неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень NfL в ЦСЖ по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, по сравнению с уровнем NfL в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

В качестве другого неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень NfL в плазме по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, по сравнению с уровнем NfL в плазме пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень NfL (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель или более, например, по меньшей мере 15 недель, по меньшей мере 20 недель или по меньшей мере 25 недель. Обычно связывающий элемент по изобретению снижает уровень NfL (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) на протяжении по меньшей мере 10 недель.

В качестве неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень NfL в ЦСЖ по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, по сравнению с уровнем NfL в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель.

В качестве другого неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень NfL в плазме по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, по сравнению с уровнем NfL в плазме пациента до введения связывающего элемента, на протяжении по меньшей мере

5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель.

Снижение pTau₂₁₇

Введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению может также снижать уровень pTau₂₁₇ у пациента по сравнению с уровнем pTau₂₁₇ у пациента до введения связывающего элемента.

Tau представляют собой белки, ассоциированные с микротрубочками, экспрессированные главным образом в нейронах. Белки tau составляют несколько изоформ и играют важную роль в сборке микротрубочек из тубулиновых мономеров и в поддержании цитоскелета и аксонального транспорта. Агрегация определенных групп белков tau в форме нитевидных включений часто отмечается во внутринейронных нейрофибриллярных клубках при многих нейродегенеративных расстройствах, включая БА. Высвобождение pTau₂₁₇ (tau, фосфорилированного по треонину 217) в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и/или плазму является биомаркером нейронального аксонального повреждения. Соответственно, как описано здесь, введение элемента, связывающегося с A β 1-42, по изобретению может поэтому найти терапевтическое применение в предупреждении и/или посредством предупреждения нейронального аксонального повреждения, такого как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА, а также нейронального аксонального повреждения, ассоциированного с другими нейродегенеративными заболеваниями или расстройствами, и/или других состояний, ассоциированных с амилоидозом, приводящих к нейрональному аксональному повреждению.

Элемент, связывающийся с A β 1-42, по изобретению может снижать уровень pTau₂₁₇ в (1) плазме, (2) ЦСЖ или (3) плазме и ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем pTau₂₁₇ у пациента до введения связывающего элемента. Предпочтительно, элемент, связывающийся с A β 1-42, по изобретению снижает уровень pTau₂₁₇ в плазме.

Уровень pTau₂₁₇ в плазме пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация pTau₂₁₇ в плазме повышен/повышена по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста (Janelictze *et al.* (2020) *Nat Commun.* 11:1683, включено сюда посредством ссылки). Повышение pTau₂₁₇ пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и

поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Типичные уровни $p\tau_{au217}$ в плазме субъектов с БА могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа образцов. Чем больше повышение $p\tau_{au217}$ в плазме до введения связывающего элемента, тем больше возможность его снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня $p\tau_{au217}$ в плазме пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня $p\tau_{au217}$ в плазме пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень $p\tau_{au217}$, такой как уровень $p\tau_{au217}$ в плазме, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнем $p\tau_{au217}$ (например, в плазме) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

В качестве неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению снижает уровень $p\tau_{au217}$, такой как уровень $p\tau_{au217}$ в плазме, по меньшей мере на 30%.

В качестве другого неограничивающего примера, у пациентов с БА уровни $p\tau_{au217}$ в плазме обычно повышены в 4-8 раз по сравнению с его уровнями у здоровых индивидов, и связывающий элемент по изобретению может снижать уровень $p\tau_{au217}$ в плазме приблизительно в 2-8 раз, то есть может снижать $p\tau_{au217}$, приближая его к нормальным уровням.

Уровень $p\tau_{au217}$ может быть определен с применением любого подходящего метода, традиционные методики известны в данной области. В качестве неограничивающего примера, уровень $p\tau_{au217}$ может быть определен с применением *in vitro* анализов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия, иммунопреципитация, аффинная хроматография и биохимические или клеточные анализы. Уровень $p\tau_{au217}$ может также быть измерен непосредственно, например, в плазме или ЦСЖ, с использованием связывающего элемента (например, антитела, специфичного в отношении $p\tau_{au217}$) в биосенсорной системе, где связывающий элемент мечен реагентом для выявления, как описано здесь. Предпочтительно, уровень $p\tau_{au217}$ (в частности уровень $p\tau_{au217}$ в плазме) определяют с применением ELISA.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень $p\tau_{au217}$ (например, уровень в плазме) за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за

8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень $p\text{Tau}_{217}$ (например, уровень в плазме) на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель или более, например, по меньшей мере 15 недель, по меньшей мере 20 недель или по меньшей мере 25 недель. Обычно связывающий элемент по изобретению снижает уровень $p\text{Tau}_{217}$ (например, уровень в плазме) на протяжении по меньшей мере 10 недель.

Снижение нейрогранина (Ng)

Введение элемента, связывающегося с $A\beta_{1-42}$, по изобретению может также обладать потенциалом снижения уровня Ng у пациента по сравнению с уровнем Ng у пациента до введения связывающего элемента.

Нейрогранин (Ng) представляет собой белок дендритов, вовлеченный в долговременную потенциацию (длительное изменение сигналов, исходящих от нейрона, в ответ на кратковременный входящий сигнал). Высвобождение Ng в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и/или плазму является биомаркером нейронального аксонального повреждения. Соответственно, как описано здесь, введение элемента, связывающегося с $A\beta_{1-42}$, по изобретению может поэтому найти терапевтическое применение в предупреждении и/или посредством предупреждения нейронального аксонального повреждения, такого как нейрональное аксональное повреждение, ассоциированное с БА, а также нейронального аксонального повреждения, ассоциированного с другими нейродегенеративными заболеваниями или расстройствами, и/или других состояний, ассоциированных с амилоидозом, приводящих к нейрональному аксональному повреждению.

Возможно, элемент, связывающийся с $A\beta_{1-42}$, по изобретению может снижать уровень Ng в (1) плазме, (2) ЦСЖ или (3) плазме и ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем Ng у пациента до введения связывающего элемента. Предпочтительно, элемент, связывающийся с $A\beta_{1-42}$, по изобретению снижает уровень Ng в ЦСЖ.

Уровень Ng в ЦСЖ пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация Ng в ЦСЖ повышен/повышена по сравнению со здоровыми

индивидами того же возраста. Повышение Ng пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Типичные уровни Ng в ЦСЖ субъектов с БА могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа образцов. Чем больше повышение Ng в ЦСЖ до введения связывающего элемента, тем больше возможность его снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня Ng в ЦСЖ пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня Ng в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению может снижать уровни Ng, приближая их к уровням, наблюдаемым у здоровых индивидов того же возраста. Это может указывать на уменьшение нейронального повреждения.

Уровень Ng может быть определен с применением любого подходящего метода, традиционные методики известны в данной области. В качестве неограничивающего примера, уровень Ng может быть определен с применением *in vitro* анализов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия, иммунопреципитация, аффинная хроматография и биохимические или клеточные анализы. Уровень Ng может также быть измерен непосредственно, например, в плазме или ЦСЖ, с использованием связывающего элемента (например, антитела, специфичного в отношении Ng) в биосенсорной системе, где связывающий элемент мечен реагентом для выявления, как описано здесь. Предпочтительно, уровень Ng (в частности уровень Ng в ЦСЖ) определяют с применением ELISA.

Амилоид бета

Элементы, связывающиеся с A β 1-42, по настоящему изобретению могут связывать и осаждают растворимый A β 1-42 в плазме крови и/или в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), снижая посредством этого уровень свободного A β 1-42 в плазме и/или ЦСЖ, соответственно. Вместе со снижением уровней NfL (как описано здесь) это представляет новый способ терапии болезни Альцгеймера и других состояний, ассоциированных с нейрональным аксональным повреждением и амилоидозом.

При использовании здесь термин «свободный» в контексте A β 1-42 обычно относится к A β 1-42, не связанному связывающим элементом по изобретению, в частности антителом, как определено здесь.

Элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению может снижать уровень свободного Аβ1-42 в (1) плазме, (2) ЦСЖ или (3) плазме и ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем свободного Аβ1-42 у пациента до введения связывающего элемента. Предпочтительно, элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению снижает уровень свободного Аβ1-42 как в плазме, так и в ЦСЖ.

Уровень свободного Аβ1-42 в плазме пациента может быть определен до введения связывающего элемента.

Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация Аβ1-42 в плазме повышен/повышена по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста. Повышение свободного Аβ1-42 пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Типичные уровни Аβ1-42 в плазме субъектов с БА могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа образцов. Чем больше повышение Аβ1-42 в плазме до введения связывающего элемента, тем больше возможность его снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня Аβ1-42 в плазме пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень свободного Аβ1-42, такой как уровень свободного Аβ1-42 в плазме, по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% или более по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 (например, в плазме) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

Уровень свободного Аβ1-42 в ЦСЖ пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Обычно у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА, уровень/концентрация Аβ1-42 в ЦСЖ повышен/повышена по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста. Повышение свободного Аβ1-42 пропорционально степени происходящего нейронального аксонального повреждения, и поэтому оно обычно нарастает со временем по мере прогрессирования заболевания. Типичные уровни Аβ1-42 в ЦСЖ субъектов с БА могут варьировать в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний, возраста субъекта и методологии забора и анализа

образцов. Чем больше повышение Аβ1-42 в ЦСЖ до введения связывающего элемента, тем больше возможность его снижения. Предпочтительно, измеряют относительное снижение уровня Аβ1-42 в ЦСЖ пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень свободного Аβ1-42, такой как уровень свободного Аβ1-42 в ЦСЖ, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% или еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 (например, в ЦСЖ) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

В результате связывания Аβ1-42 со связывающим элементом по изобретению период полувыведения связанного Аβ1-42 превышает период полувыведения свободного Аβ1-42. Вследствие этого, несмотря на возможное снижение уровня свободного Аβ1-42 после введения связывающего элемента по изобретению, общее количество Аβ1-42 может возрастать.

Соответственно, элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 в (1) плазме, (2) ЦСЖ или (3) плазме и ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем общего Аβ1-42 у пациента до введения связывающего элемента. Предпочтительно, элемент, связывающийся с Аβ1-42, по изобретению повышает уровень общего Аβ1-42 как в плазме, так и в ЦСЖ.

Уровень общего Аβ1-42 в плазме пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Предпочтительно, измеряют относительное повышение уровня общего Аβ1-42 в плазме пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня общего Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно повышает уровень общего Аβ1-42, такой как уровень общего Аβ1-42 в плазме, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300% или более

по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 (например, в плазме) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

Уровень общего Аβ1-42 в ЦСЖ пациента может быть определен до введения связывающего элемента. Предпочтительно, измеряют относительное повышение уровня общего Аβ1-42 в ЦСЖ пациента после введения связывающего элемента по изобретению, например, относительно уровня общего Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно повышает уровень общего Аβ1-42, такой как уровень общего Аβ1-42 в ЦСЖ, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300% или более по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 (например, в ЦСЖ) у пациента до введения указанного связывающего элемента.

Обычно введение связывающего элемента по изобретению не оказывает эффекта или оказывает минимальный эффект на уровень Аβ1-40 (свободного и/или общего) в плазме и/или ЦСЖ пациента по сравнению с соответствующим уровнем Аβ1-40 до введения связывающего элемента.

Настоящее изобретение может включать непосредственное измерение уровней Аβ1-42 и/или Аβ1-40, например, в плазме или ЦСЖ, с использованием связывающего элемента по изобретению, например, в биосенсорной системе. Например, метод выявления и/или измерения связывания с человеческим Аβ1-42 и/или Аβ1-40 может включать (1) приведение указанного связывающего элемента в контакт с Аβ1-42 и/или Аβ1-40 и (2) выявление связывания указанного связывающего элемента с Аβ1-42 и/или Аβ1-40, где связывание выявляют с применением любого метода или агента для выявления, описанного здесь. Аβ1-42 и/или Аβ1-40 могут представлять собой мономерный или олигомерный Аβ1-42, предпочтительно мономерный Аβ1-42 и/или Аβ1-40. Уровень (свободного и/или общего) Аβ1-42 и/или Аβ1-40 может быть определен с применением любого подходящего метода, традиционные методики известны в данной области. В качестве неограничивающего примера, уровень (свободного и/или общего) Аβ1-42 и/или Аβ1-40 может быть определен с применением *in vitro* анализов, таких как электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ECLIA), ELISA, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия, иммунопреципитация, аффинная хроматография и биохимические или клеточные анализы. Уровень (свободного и/или общего) Аβ1-42 и/или Аβ1-40 может также быть измерен непосредственно, например, в плазме или ЦСЖ, с использованием

связывающего элемента (например, антитела, специфичного в отношении Аβ1-42 и/или Аβ1-40) в биосенсорной системе, где связывающий элемент мечен реагентом для выявления, как описано здесь. Предпочтительно, уровень (свободного и/или общего) Аβ1-42 и/или Аβ1-40 (в частности уровень (свободного и/или общего) Аβ1-42 и/или Аβ1-40 в плазме и/или ЦСЖ) определяют с применением ECLIA.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень свободного Аβ1-42 (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) за 3-20 недель, 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 (например, в плазме и/или ЦСЖ) за тот же интервал.

В качестве неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень свободного Аβ1-42 в ЦСЖ по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 в ЦСЖ по меньшей мере на 200%, по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

В качестве другого неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень свободного Аβ1-42 в плазме по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за 12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 в плазме по меньшей мере на 200%, по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента, за 3-20 недель, за 5-20 недель, предпочтительно за 8-16 недель, более предпочтительно за

12 недель, еще более предпочтительно за 3 недели после введения связывающего элемента.

Связывающий элемент по изобретению обычно снижает уровень свободного Аβ1-42 (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно по меньшей мере 12 недель или более, например, по меньшей мере 15 недель, по меньшей мере 20 недель или по меньшей мере 25 недель. Обычно связывающий элемент по изобретению снижает уровень свободного Аβ1-42 (например, уровень в плазме и/или ЦСЖ) на протяжении по меньшей мере 10 недель. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 (например, в плазме и/или ЦСЖ) на протяжении того же интервала.

В качестве другого неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень свободного Аβ1-42 в ЦСЖ по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 в ЦСЖ по меньшей мере на 200%, по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 в ЦСЖ пациента до введения связывающего элемента, на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель.

В качестве другого неограничивающего примера, связывающий элемент по изобретению может снижать уровень свободного Аβ1-42 в плазме по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, по сравнению с уровнем свободного Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента, на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель. Связывающий элемент по изобретению может повышать уровень общего Аβ1-42 в плазме по меньшей мере на 200%, по сравнению с уровнем общего Аβ1-42 в плазме пациента до введения связывающего элемента, на протяжении

по меньшей мере 5 недель, предпочтительно на протяжении по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно на протяжении по меньшей мере 12 недель.

Другие биомаркеры

Согласно изобретению также возможны измерение или мониторинг эффекта введения связывающего элемента по изобретению на другие биомаркеры нейронального аксонального повреждения и/или амилоидоза, или заболеваний или расстройств, ассоциированных с нейрональным аксональным повреждением и/или амилоидозом. Альтернативно и/или дополнительно, согласно изобретению также возможны измерение или мониторинг эффекта введения связывающего элемента по изобретению на другие биомаркеры, указывающего на здоровые аксоны нейронов, нейропротективное состояние и/или антиамилоидогенное состояние.

Неограничивающие примеры других биомаркеров, которые можно мониторировать или измерять согласно изобретению включают pTau₁₈₁ и tTau. Связывающие элементы могут не оказывать эффекта или оказывать минимальный эффект на уровни других биомаркеров, таких как pTau₁₈₁ и tTau (например, в плазме и/или ЦСЖ), после введения связывающего элемента по сравнению с соответствующими уровнями до введения.

Визуализационные аномалии, связанные с амилоидом (ARIA)

Визуализационные аномалии, связанные с амилоидом (amyloid-related imaging abnormalities, ARIA) представляют собой аномальные отличия, наблюдаемые при нейровизуализации у пациентов с болезнью Альцгеймера, ассоциированные с традиционной амилоид-модифицирующей терапией. Выделяют два типа ARIA: ARIA-E и ARIA-H.

ARIA-E характеризуется отеком головного мозга, включающим разрыв плотных контактов в гематоэнцефалическом барьере и приводящим к повышению проницаемости и накоплению жидкости. ARIA-E можно выявить магнитно-резонансной томографией (MPT), которая позволяет определить признаки вазогенного отека (VE) и/или выпот в бороздах в режиме инверсионного восстановления с подавлением сигнала от жидкости (FLAIR). Симптомы могут варьировать в зависимости от локализации и степени выраженности накопления жидкости и включают изменения сознания, головную боль, рвоту/тошноту и нарушения походки.

ARIA-H характеризуется церебральными микрокровоизлияниями (mH), часто сопровождающимися гемосидерозом. Они могут быть определены как небольшие

округлые и малоинтенсивные очаги, характеризующиеся сигналом гемосидериновых отложений и поверхностным сидерозом в режиме T2*-взвешенного градиентного эхо (T2*-GRE) или визуализации, взвешенной по чувствительности (SWI), в качестве признаков церебральной амилоидной ангиопатии (ЦАА). mH могут быть определены как очаги размером 10 мм или менее, в некоторых случаях 5 мм или менее.

Обычно введение связывающего элемента по изобретению не приводит к повышению частоты каких-либо ARIA, применительно к ARIA-E и/или ARIA-H, предпочтительно как ARIA-E, так и ARIA-H.

В качестве неограничивающего примера, пациент, которому вводят связывающий элемент по изобретению может не демонстрировать повышения частоты ARIA-E и/или ARIA-H, предпочтительно как ARIA-E, так и ARIA-H, на протяжении по меньшей мере 5 недель, предпочтительно по меньшей мере 10 недель, более предпочтительно по меньшей мере 12 недель или более, например, по меньшей мере 15 недель, по меньшей мере 20 недель, по меньшей мере 25 недель.

Терапия и скрининг

Согласно изобретению, предложен способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим A β 1-42, пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где связывающий элемент снижает уровень NfL у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

Согласно изобретению, предложен связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим A β 1-42 для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения, где связывающий элемент снижает уровень NfL у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

Согласно изобретению предложено применение связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим A β 1-42 в изготовлении лекарственного средства для способа предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение терапевтически эффективного количества

связывающего элемента пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения, где связывающий элемент снижает уровень NfL у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

При использовании здесь термин «лечить» или «лечение» включает профилактическое лечение (например, для предупреждения начала нейронального аксонального повреждения), а также корректирующее лечение (лечение субъекта, уже страдающего от нейронального аксонального повреждения). Предпочтительно, при использовании здесь термин «лечить» или «лечение» обозначает корректирующее лечение. Термин «лечить» или «лечение» включает лечение как нейронального аксонального повреждения, так и его симптомов и заболеваний/расстройств, ассоциированных с нейрональным аксональным повреждением. В некоторых воплощениях термин «лечить» или «лечение» относится к симптому нейронального аксонального повреждения. В одном воплощении «лечение» может быть определено как обеспечение снижения уровня NfL у пациента, как описано здесь. Например, после введения A β 1-42 уровень NfL в плазме пациента может быть снижен по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, и/или уровень NfL в ЦСЖ пациента может быть снижен по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, по сравнению с уровнем NfL в плазме и/или ЦСЖ пациента до введения ингибитора, предпочтительно за 8-16 недель после введения элемента, связывающегося с A β 1-42 (например, как описано более подробно здесь).

Таким образом, элемент, связывающийся с A β 1-42 (такой как антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант), может быть введен субъекту в терапевтически эффективном количестве или профилактически эффективном количестве.

«Терапевтически эффективное количество» представляет собой любое количество элемента, связывающегося с A β 1-42, которое при его введении, самого по себе или в комбинации, пациенту для предупреждения дальнейшего нейронального аксонального повреждения (или лечения нейронального аксонального повреждения), или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением, является достаточным для обеспечения такого лечения нейронального аксонального повреждения, или его симптома, или ассоциированного заболевания. «Профилактически эффективное количество» представляет собой любое количество

элемента, связывающегося с A β 1-42, которое при его введении, самого по себе или в комбинации, субъекту ингибирует или задерживает начало или повторное развитие нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением). В некоторых воплощениях профилактически эффективное количество полностью предотвращает начало или повторное развитие нейронального аксонального повреждения. «Ингибирование» начала обозначает либо уменьшение вероятности начала нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением), либо полное предотвращение его начала. Примерами терапевтически эффективного количества и/или профилактически эффективного количества (в частности, где элемент, связывающийся с A β 1-42, представляет собой антитело по изобретению, в частности антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант) являются 200 мг, 300 мг, 900 мг или 1800 мг, предпочтительно вводимые с частотой один раз в 4 недели (например, как описано более подробно здесь).

Термины «субъект», «индивид» и «пациент» использованы здесь взаимозаменяемо для обозначения субъекта-млекопитающего. Обычно пациент может представлять собой человека; иными словами, в одном воплощении «пациент» представляет собой человека. Начало нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением) могло не быть диагностировано у пациента ранее. Альтернативно, начало нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением) могло быть диагностировано у пациента ранее. Пациент может также представлять собой пациента, демонстрирующего факторы риска заболевания, или пациента без симптомов начала нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением). Пациент может также представлять собой пациента, страдающего от начала нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением), или пациента с риском развития начала нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением).

Путь введения может быть выбран из перорального, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального, ингаляционного, местного или их комбинации. Предпочтительно, путь введения является внутривенным или подкожным. Таким образом, в способах по изобретению элемент, связывающийся с А β 1-42, может быть введен пациенту внутривенно или подкожно.

Как описано выше, согласно настоящему изобретению предложено предупреждение нейронального аксонального повреждения, и поэтому предложено лечение нейронального аксонального повреждения при заболеваниях, ассоциированных с нейрональным аксональным повреждением, таких как БА.

Термин «до введения» может быть использован здесь взаимозаменяемо с термином «исходно» или «исходный», обозначающим временную точку незадолго до начала введения (или непосредственно предшествующую началу введения).

Уровень NfL и любых других молекул или маркеров, указанных здесь (например, свободного А β 1-42), может быть измерен любым подходящим способом, примеры и предпочтительные способы описаны здесь. В качестве неограничивающего примера, элемент, связывающийся с А β 1-42, может снижать уровень NfL у пациента за 8-16 недель (предпочтительно за 12 недель, более предпочтительно за 3 недели) после введения элемента, связывающегося с А β 1-42. Иными словами, введение элемента, связывающегося с А β 1-42, обеспечивает снижение (например, уменьшение) уровня NfL у пациента за 8-16 недель после введения. Предпочтительно, введение элемента, связывающегося с А β 1-42, может обеспечивать снижение (например, уменьшение) уровня NfL у пациента за 12 недель после введения, еще более предпочтительно за 3 недели после введения.

Элемент, связывающийся с А β 1-42, может снижать уровень NfL у пациента относительно исходного уровня за 8-16 недель (предпочтительно за 12 недель, более предпочтительно за 10 недель, еще более предпочтительно за 5 недель). Иными словами, введение элемента, связывающегося с А β 1-42, обеспечивает снижение (например, уменьшение) уровня NfL у пациента относительно исходного уровня за 8-16 недель. Предпочтительно, введение элемента, связывающегося с А β 1-42, может обеспечивать снижение (например, уменьшение) уровня NfL у пациента относительно исходного уровня за 12 недель, более предпочтительно за 10 недель, еще более предпочтительно за 5 недель.

Снижение (например, уменьшение) NfL или любых других молекул или маркеров может сохраняться (например, продолжаться) на протяжении нескольких недель или месяцев после введения.

Элемент, связывающийся с A β 1-42, может снижать уровень NfL у пациента на протяжении по меньшей мере 16 недель. Например, введение элемента, связывающегося с A β 1-42, может обеспечивать снижение уровня NfL у пациента (например, продолжительным образом) на протяжении по меньшей мере 5, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 38, 32, 36 или 40 недель. Например, введение элемента, связывающегося с A β 1-42, может обеспечивать снижение уровня NfL у пациента (например, продолжительным образом) на протяжении по меньшей мере 5 недель. Введение элемента, связывающегося с A β 1-42, может обеспечивать снижение уровня NfL у пациента (например, продолжительным образом) на протяжении по меньшей мере 10 недель. Например, введение элемента, связывающегося с A β 1-42, может обеспечивать снижение уровня NfL у пациента (например, продолжительным образом) на протяжении по меньшей мере 20 недель.

Способы и связывающие элементы по изобретению применимы в предупреждении нейронального аксонального повреждения и, таким образом, в лечении нейронального аксонального повреждения, ассоциированного с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БА. При использовании здесь термин «нейрональное аксональное повреждение» включает нарушение аксональных связей (как немедленное, так и отсроченное вторичное нарушение связей), разрушение аксонального цитоскелета, нарушение аксонального транспорта, прогрессирующее набухание и дегенерацию. Это повреждение можно наблюдать посредством гистологического анализа или других подходящих методик визуализации. Кроме того, для выявления нейронального аксонального повреждения могут быть применены стандартные методики клинической визуализации, такие как МРТ и КТ; такие методики являются рутинными в данной области.

Кроме того, способы и связывающие элементы по изобретению применимы в лечении симптомов нейронального аксонального повреждения. Неограничивающие примеры таких симптомов включают изменения сознания, головную боль, рвоту/тошноту и нарушения походки.

Нейрональное аксональное повреждение ассоциировано с множеством нейродегенеративных заболеваний и расстройств, включая болезнь Альцгеймера. Таким

образом, способы и связывающие элементы по изобретению применимы в лечении заболеваний и расстройств, ассоциированных с (в том числе заболеваний/расстройств, по меньшей мере частично вызванных) нейрональным аксональным повреждением. Предпочтительно, способы и связывающие элементы по изобретению применимы в лечении БА, особенно предпочтительно в лечении БА в легкой или среднетяжелой форме и/или пресимптоматической стадии БА (также называемой доклинической БА). Способы и связывающие элементы по изобретению могут быть применимы в лечении легкого когнитивного расстройства (ЛКР) вследствие БА.

БА можно классифицировать как легкую или среднетяжелую БА с применением критериев, изложенных в McKhann *et al.* (Alzheimers Dement. 2011 May; 7(3): 263–269) и Albert *et al.* (Alzheimers Dement. 2011 May; 7(3): 270–279), каждое из которых полностью включено сюда посредством ссылки. Кратко, легкая или среднетяжелая БА может характеризоваться: (1) беспокойностью относительно изменения когнитивных функций у пациента; (2) нарушением в одном или более чем одном когнитивном домене (включая память, исполнительные функции, внимание, речь и зрительно-пространственные навыки); (3) легкими проблемами при выполнении сложных функциональных задач при сохранении независимости по функциональным способностям; и (4) отсутствием деменции. Классификация БА на легкую/среднетяжелую/тяжелую является стандартной клинической практикой, и специалист в данной области легко поймет значение термина «легкая или среднетяжелая БА».

Согласно руководствам Национальных институтов здоровья (National Institutes of Health) и Ассоциации Альцгеймера (Alzheimer's Association) (НИН-АА), пресимптоматическая стадия БА может быть диагностирована на основании изменений в головном мозге пациента, включая накопление амилоида и другие изменения нервных клеток, но при отсутствии у указанного пациента очевидных значимых клинических симптомов.

Согласно НИН-АА, легкое когнитивное расстройство (ЛКР) определено симптомами проблем с памятью и/или других проблем с мышлением, не соответствующих возрасту и образованию человека, но не приводящих к утрате независимости. Для диагностики ЛКР обычно необходимо все из следующего: (1) беспокойность изменением когнитивных функций относительно предшествующих показателей; (2) нарушение одной или более чем одной когнитивной функции, такой как

память и решение задач, не соответствующее возрасту и образованию человека (при этом память является функцией, нарушения которой наиболее распространены у людей, у которых ЛКР прогрессирует до более выраженной деменции вследствие БА); (3) сохранение способности к независимому функционированию в повседневной жизни, несмотря на то, что некоторые сложные задачи могут быть более трудными, чем раньше; и (4) отсутствие деменции. Возможна долгосрочная оценка когнитивных функций для получения данных об их прогрессирующем снижении. Могут быть проведены дополнительные диагностические тесты для подтверждения того, что ЛКР обусловлена БА и не связана с другими причинами, такими как другие заболевания головного мозга, лекарственные средства, депрессия или серьезные изменения в жизни.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ оценки эффективности способа лечения, как определено здесь, включающий определение уровня NfL у пациента до введения связывающего элемента и после введения связывающего элемента, где способ лечения эффективен, если уровень NfL у пациента после введения связывающего элемента снижен по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента. Снижение уровня NfL может быть таким, как описано здесь. В качестве неограничивающего примера, лечение по изобретению можно считать эффективным, если уровень NfL в плазме пациента снижен после введения связывающего элемента, возможно, где снижение уровня NfL в плазме представляет собой снижение по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%. В качестве другого неограничивающего примера, лечение по изобретению можно считать эффективным, если уровень NfL в ЦСЖ пациента снижен после введения связывающего элемента, возможно, где снижение уровня NfL в ЦСЖ представляет собой снижение по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 50%.

Эффективность лечения по изобретению может также быть определена посредством оценки уровня любых других молекул/маркеров, описанных здесь, аналогичным образом. Например, такой способ оценки эффективности способа лечения, как определено здесь, может включать определение уровня свободного A β 1-42 (в плазме и/или ЦСЖ) у пациента до введения связывающего элемента и после введения связывающего элемента, где способ лечения эффективен, если уровень свободного A β 1-42 (в плазме и/или ЦСЖ) у пациента после введения связывающего элемента снижен по сравнению с уровнем свободного A β 1-42 (в плазме и/или ЦСЖ) у пациента до введения связывающего элемента. Снижение/повышение уровня любых других

молекул/маркеров (например, свободного A β 1-42) может быть таким, как описано здесь. Альтернативно или дополнительно, эффективность лечения по изобретению может также быть определена посредством оценки других клинических индикаторов успешного лечения нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением). Например, при применении изобретения для лечения БА, для определения эффективности лечения может быть использовано любое уменьшение клинических симптомов БА (включая описанные здесь) и/или замедление прогрессирования БА до более тяжелого класса БА по сравнению с индивидами, которым не вводят связывающий элемент по изобретению, в комбинации с оценкой уровней NfL (и/или любых уровней любых других молекул/маркеров, описанных здесь).

Способы определения эффективности лечения по изобретению могут включать оценку уровня NfL в комбинации с оценкой уровня любой другой молекулы / любого другого маркера по изобретению (в частности свободного A β 1-42 (в плазме и/или ЦСЖ)).

Способы по изобретению могут быть осуществлены у пациентов, положительных по амилоиду. Способы по изобретению могут быть осуществлены у пациентов, которые: (1) положительны по амилоиду (A+); (2) положительны по амилоиду (A+) и отрицательны по тау (T-); (3) положительны по амилоиду (A+) и отрицательны по нейродегенерации (N-); (4) положительны по амилоиду (A+), отрицательны по тау (T-) и отрицательны по нейродегенерации (N-); (5) положительны по амилоиду (A+) и положительны по тау (T+); (6) положительны по амилоиду (A+) и положительны по нейродегенерации (N+); (7) положительны по амилоиду (A+), положительны по тау (T+) и положительны по нейродегенерации (N+); (8) положительны по амилоиду (A+), положительны по тау (T+) и отрицательны по нейродегенерации (N-); или (9) положительны по амилоиду (A+), отрицательны по тау (T-) и положительны по нейродегенерации (N+). Пациент, положительный по амилоиду/тау/нейродегенерации, может быть взаимозаменяемо назван здесь пациентом с положительным статусом по амилоиду/тау/нейродегенерации. Сходным образом, пациент, отрицательный по амилоиду/тау/нейродегенерации, может быть взаимозаменяемо назван здесь пациентом с отрицательным статусом по амилоиду/тау/нейродегенерации.

Соответственно, способы по изобретению могут дополнительно включать одну или более чем одну стадию определения того, что пациент положителен по амилоиду.

Способы по изобретению могут включать одну или более чем одну стадию определения пациентов, которые: (1) положительны по амилоиду (A+); (2) положительны по амилоиду (A+) и отрицательны по тау (T-); (3) положительны по амилоиду (A+) и отрицательны по нейродегенерации (N-); (4) положительны по амилоиду (A+), отрицательны по тау (T-) и отрицательны по нейродегенерации (N-); (5) положительны по амилоиду (A+) и положительны по тау (T+); (6) положительны по амилоиду (A+) и положительны по нейродегенерации (N+); (7) положительны по амилоиду (A+), положительны по тау (T+) и положительны по нейродегенерации (N+); (8) положительны по амилоиду (A+), положительны по тау (T+) и отрицательны по нейродегенерации (N-); или (9) положительны по амилоиду (A+), отрицательны по тау (T-) и положительны по нейродегенерации (N+).

Оценку статуса пациента по амилоиду, статуса пациента по тау и/или статуса пациента по нейродегенерации обычно проводят в соответствии с руководствами по диагностике болезни Альцгеймера, в частности в соответствии с классификацией National Institute on Aging's Alzheimer's Association (NIA-AA) Research Framework's Amyloid, Tau, Neurodegeneration (ATN) Classification, как описано в Cummings in *Alzheimer's & Dementia* (2019) 15:172-178 (полностью включено сюда посредством ссылки, с особой ссылкой на Таблицы 1 и 2) и Jack *et al.* (*Neurology* (2016) 87(5):539-547, также полностью включено сюда посредством ссылки). Таким образом, статус пациента по амилоиду может быть определен с применением ЦСЖ-маркера и/или визуализационного маркера, где, возможно, ЦСЖ-маркером амилоида является A β 1-42 в ЦСЖ и/или визуализационным маркером амилоида является визуализация амилоида. Могут также быть применены другие способы определения статуса пациента по амилоиду. Например, согласно изобретению может быть использован плазменный биомаркер амилоида. По мере разработки других биомаркеров амилоида они могут также быть использованы для определения статуса пациента по амилоиду при определении того, что пациенты являются подходящими для лечения по изобретению.

Статус пациента по тау может быть определен с применением ЦСЖ-маркера и/или визуализационного маркера, где, возможно, тау-маркером амилоида является фосфо-тау (p-tau) в ЦСЖ и/или визуализационным маркером тау является визуализация тау, например, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) на предмет тау. Статус пациента по нейродегенерации может быть определен с применением ЦСЖ-маркера и/или визуализационного маркера, где, возможно, ЦСЖ-маркером нейродегенерации

является общий тау (tTau или t-tau) в ЦСЖ и/или визуализационным маркером нейродегенерации является атрофия при магнитно-резонансной томографии (МРТ) или ПЭТ с фтордезоксиглюкозой (ФДГ). ЦСЖ-маркеры и/или визуализационные маркеры амилоида, тау и нейродегенерации могут быть выбраны независимо. Во избежание сомнений, нормальная рутинная практика специалиста в данной области подразумевает определение статуса пациента по амилоиду, статуса пациента по тау и/или статуса пациента по нейродегенерации без излишних усилий с применением таких ЦСЖ-маркеров и/или визуализационных маркеров (например, как описано в *Alzheimer's & Dementia* (2019) 15:172-178) и, таким образом, определение того, что пациенты являются подходящими для лечения по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, в качестве отсечки для определения положительного или отрицательного статуса по амилоиду, статуса по тау и/или статуса по нейродегенерации может быть использован 95-й перцентиль, рассчитанный для здоровой контрольной/эталонной популяции. Альтернативным способом может быть выбор точек отсечки по (наиболее нормальному) 10-му перцентилю значений, обычно наблюдаемых при деменции вследствие БА. Дополнительное обсуждение методов диагностики пациента с БА и, таким образом, пациента, для которого настоящее изобретение может быть полезным, приведено в *J. Alzheimers Dis.* (2017) 57(3):645-665 (полностью включено сюда посредством ссылки). Могут также быть применены другие рутинные диагностические/скрининговые критерии, включая когнитивные и/или функциональные исследования. В качестве неограничивающего примера, рутинные диагностические/скрининговые критерии легкой или среднетяжелой БА включают показатель от 16 до 26 по Краткой шкале оценки психического статуса (Mini-Mental State Exam, MMSE) для БА и/или показатель 4 или менее по шкале Хачинского для оценки ишемии в модификации Розена. Эти типичные методы также являются рутинной практикой для специалиста в данной области.

Согласно изобретению также предложен способ определения того, что пациент является подходящим для лечения по изобретению (также взаимозаменяемо называемый здесь способом скрининга для определения пациентов, подходящих для лечения по изобретению), включающий определение уровня NfL у пациента до введения связывающего элемента, и где определяют, что пациент является подходящим для способа лечения, если у пациента: (1) концентрация NfL в плазме до введения связывающего элемента составляет 20 пг/мл или более, 15 пг/мл или более, 12 пг/мл или

более или 10 пг/мл или более, предпочтительно 15 пг/мл или более; и/или (2) концентрация NfL в ЦСЖ до введения связывающего элемента составляет 1 нг/мл или более, 800 пг/мл или более, 600 пг/мл или более или 500 пг/мл или более, предпочтительно 600 пг/мл или более.

Определить то, что пациент является подходящим для лечения по изобретению, можно также посредством оценки уровня любых других молекул/маркеров, описанных здесь, аналогичным образом. Например, такой способ определения того, что пациент является подходящим для способа лечения, как определено здесь, может включать определение уровня свободного Аβ1-42 (в плазме и/или ЦСЖ) у пациента до введения связывающего элемента, где определяют, что пациент является подходящим для лечения, если уровень свободного Аβ1-42 (в плазме и/или ЦСЖ) превышает исходный уровень, как описано здесь. Исходный уровень любых других молекул/маркеров (например, свободного Аβ1-42) до введения может быть таким, как описано здесь. В качестве неограничивающего примера, пациент может быть подходящим для лечения по изобретению при уровне Аβ1-42 в ЦСЖ до введения приблизительно 550 пг/мл или менее или приблизительно 550 нг/л или менее, как измерено с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), предназначенного для использования исключительно в научно-исследовательских целях (Research Use Only, RUO) от Innogenetics, или при соответствующих уровнях Аβ1-42 в случае применения других доступных анализов (поскольку значение отсечки может варьировать в зависимости от применяемого анализа). Уровень Аβ1-42 в ЦСЖ приблизительно 550 пг/мл или менее или приблизительно 550 нг/л (при применении RUO ELISA от Innogenetics) указывает на большое количество амилоидных бляшек, то есть на то, что пациент положителен по амилоиду (А+). Несмотря на то, что эти отсечки или пороговые значения могут быть полезны для определения пациентов с легкой или среднетяжелой БА для лечения, подходящие отсечки / пороговые значения могут варьировать в зависимости от популяции пациентов для лечения, которыми могут быть, например, пациенты с пресимптоматической/доклинической БА или индивиды с синдромом Дауна (СД), у которых, кроме этого, есть БА. Рутинные навыки клинициста включают применение стандартных методик, таких как методики, описанные здесь, для измерения амилоида/Аβ1-42 и определения пациентов, подходящих для лечения по настоящему изобретению, исходя из известных диагностических отсечек / пороговых значений для различных популяций пациентов с БА.

Альтернативно или дополнительно, определить то, что пациент является подходящим для лечения по изобретению, можно также посредством оценки других клинических индикаторов нейронального аксонального повреждения (или его симптома, или заболевания, ассоциированного с нейрональным аксональным повреждением). Например, при применении изобретения для лечения БА, для определения того, что пациент является подходящим для лечения, классификация клинических симптомов БА у пациента, используемая клиницистом (с применением стандартных критериев клинической классификации, как описано здесь), может быть применена в комбинации с оценкой уровней NfL (и/или любых уровней любых других молекул/маркеров, описанных здесь).

В частности, согласно настоящему изобретению предложен способ определения того, что пациент является подходящим для лечения по настоящему изобретению, включающий оценку статуса пациента по амилоиду с применением подходящего маркера (например, ЦСЖ-маркера, плазменного маркера и/или визуализационного маркера) до введения связывающего элемента, где определяют, что пациент является подходящим для лечения по изобретению, если статус пациента по амилоиду положителен. Указанный способ определения может дополнительно включать оценку (1) статуса пациента по тау, (2) статуса пациента по нейродегенерации или (3) статуса пациента по тау и статуса пациента по нейродегенерации до введения связывающего элемента, где ЦСЖ-маркер и/или визуализационный маркер тау и/или нейродегенерации выбраны независимо и где определяют, что пациент является подходящим для способа лечения если пациент: (1) положителен по амилоиду (A+); (2) положителен по амилоиду (A+) и отрицателен по тау (T-); (3) положителен по амилоиду (A+) и отрицателен по нейродегенерации (N-); (4) положителен по амилоиду (A+), отрицателен по тау (T-) и отрицателен по нейродегенерации (N-); (5) положителен по амилоиду (A+) и положителен по тау (T+); (6) положителен по амилоиду (A+) и положителен по нейродегенерации (N+); (7) положителен по амилоиду (A+), положителен по тау (T+) и положителен по нейродегенерации (N+); (8) положителен по амилоиду (A+), положителен по тау (T+) и отрицателен по нейродегенерации (N-); или (9) положителен по амилоиду (A+), отрицателен по тау (T-) и положителен по нейродегенерации (N+).

Оценку статуса пациента по амилоиду, статуса пациента по тау и/или статуса пациента по нейродегенерации проводят, как описано здесь. ЦСЖ-маркеры и визуализационные маркеры амилоида, тау и нейродегенерации описаны здесь.

Способы определения того, что пациент является подходящим для лечения по изобретению, могут включать оценку уровня NfL в комбинации с оценкой уровня любой другой молекулы / любого другого маркера по изобретению (в частности свободного A β 1-42 (в плазме и/или ЦСЖ)) и/или в комбинации с любым другим стандартным маркером или обследованием для оценки БА.

Наборы

Согласно изобретению также предложен набор, содержащий: (1) первый связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (A β 1-42); и (2) второй связывающий элемент, специфично связывающийся с NfL. Обычно первый связывающий элемент представляет собой антитело по изобретению, как определено здесь, предпочтительно антитело MEDI1814/Abet0380-GL или Abet0380 или его функциональный вариант. Вторым связывающим элементом (специфично связывающимся с NfL) обычно представляет собой антитело.

Первый связывающий элемент и/или второй связывающий элемент могут быть мечены с использованием реагента для выявления, как описано здесь, что позволяет выявлять их реактивность в образце. Кроме того, (первый) связывающий элемент, селективно связывающийся с A β 1-42, и/или (второй) связывающий элемент, специфично связывающийся с NfL, могут быть или могут не быть присоединены к твердой подложке.

Компоненты набора обычно стерильны и представлены в герметично закрытых флаконах или других контейнерах. Наборы могут быть использованы в диагностическом анализе или других способах, как описано здесь

Набор может содержать инструкции по применению компонентов в способе, например, способе по настоящему изобретению. В набор по изобретению могут быть включены вспомогательные вещества, способствующие осуществлению такого способа или позволяющие осуществлять такой способ. Вспомогательные вещества включают третий отличный связывающий элемент, который связывается с (первым) связывающим элементом, селективно связывающимся с A β 1-42, и/или четвертый отличный связывающий элемент, который связывается с (вторым) связывающим элементом, специфично связывающимся с NfL. Обычно одно или оба из третьего и четвертого связывающих элементов представляют собой антитела, и каждое из них, возможно, может быть конъюгировано с агентом для выявления, как описано здесь (например,

флуоресцентной меткой, радиоактивным изотопом или ферментом). Наборы на основе антител могут также содержать гранулы для проведения иммунопреципитации.

Каждый компонент наборов обычно представлен в своем подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы обычно содержат отдельные контейнеры, подходящие для каждого компонента (присутствует каждый связывающий элемент). Кроме того, наборы могут содержать инструкции по проведению анализа и методы интерпретации и анализа данных, полученных при проведении анализа.

Гомология последовательностей

Для определения процента идентичности может быть применен любой из множества методов выравнивания последовательностей, включая, без ограничения, глобальные методы, локальные методы и гибридные методы, такие как, например, сегментные методы. Протоколы определения процента идентичности представляют собой рутинные методики для специалиста в данной области. Глобальные методы позволяют выравнивать последовательности от начала до конца молекулы и определять наилучшее выравнивание сложением показателей отдельных пар остатков с применением штрафов за разрывы. Неограничивающие методы включают, например: CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson *et al.*, CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994); и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Локальные методы позволяют выравнивать последовательности, определяя один или более чем один консервативный мотив, общий для всех внесенных последовательностей. Неограничивающие методы включают, например: Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) *CABIOS* 501 -509 (1992); генерацию выборки по Гиббсу, см., например, C. E. Lawrence *et al.*, Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) *Science* 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Waſſe *et al.*, Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

Таким образом, процент идентичности определяют обычными методами. См., например, Altschul *et al.*, Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986, и Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992. Кратко, две аминокислотные последовательности выравнивают для оптимизации показателей выравнивания с использованием штрафа за открытие разрыва 10, штрафа за продолжение разрыва 1 и матрицы показателей «blosum 62» по Henikoff and Henikoff (там же), как показано ниже (аминокислоты указаны стандартными однобуквенными кодами).

«Процент идентичности» двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей является функцией числа идентичных положений в этих последовательностях. Таким образом, % идентичности может быть рассчитан как отношение числа идентичных нуклеотидов/аминокислот к общему числу нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. При расчете % идентичности последовательностей можно также учитывать число разрывов и длину каждого разрыва, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух или более последовательностей могут быть проведены с применением особых математических алгоритмов, таких как BLAST, известных специалисту в данной области.

Показатели выравнивания для определения процента идентичности

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Затем процент идентичности рассчитывают следующим образом:

[общее число идентичных совпадений / длина более длинной последовательности плюс число разрывов, введенных в более длинную последовательность для выравнивания двух последовательностей] x 100.

По существу гомологичные полипептиды характеризуются как имеющие одну или более чем одну аминокислотную замену, делецию или присоединение. Предпочтительно, эти изменения имеют незначительный характер, то есть представляют собой: консервативные аминокислотные замены (как описано здесь) и другие замены, не оказывающие существенного влияния на структуру или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до приблизительно 30 аминокислот; и небольшие N- или C-концевые расширения, такие как N-концевой метиониновый остаток,

небольшой линкерный пептид длиной до приблизительно 20-25 остатков или аффинная метка.

Помимо 20 стандартных аминокислот, аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены на нестандартные аминокислоты (такие как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомаасляная кислота, изовалин и α -метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, не кодируемых генетическим кодом, и искусственных аминокислот. Полипептиды по настоящему изобретению могут также содержать аминокислотные остатки, не встречающиеся в природе.

Аминокислоты, не встречающиеся в природе, включают, без ограничения, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. В данной области известно несколько методов включения аминокислотных остатков, не встречающихся в природе, в белки. Например, может быть применена *in vitro* система, где для подавления нонсенс-мутаций используют химически аминокислотированные супрессорные тРНК. Методы синтеза аминокислот и аминокислотированных тРНК известны в данной области. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, проводят в бесклеточной системе, содержащей S30-экстракт *E. coli* с имеющимися в продаже ферментами и другими реагентами. Белки очищают хроматографией. См., например: Robertson *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman *et al.*, Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung *et al.*, Science 259:806-9, 1993; и Chung *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993. Во втором методе трансляцию проводят в ооцитах *Xenopus* посредством микроинъекции мутантной мРНК и химически аминокислотированных супрессорных тРНК (Turcatti *et al.*, J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). В третьем методе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие естественной аминокислоты, которую следует заменить (например, фенилаланина), и в присутствии одной или более чем одной желаемой аминокислоты, не встречающейся в природе (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Вместо включения в полипептид естественной аминокислоты происходит включение аминокислоты, не встречающейся в природе. См. Koide *et al.*,

Biochem. 33:7470-6, 1994. Аминокислотные остатки, встречающиеся в природе, могут быть преобразованы в их разновидности, не встречающиеся в природе, посредством химической модификации *in vitro*. Химическую модификацию можно комбинировать с сайт-направленным мутагенезом для дополнительного расширения спектра замен (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

Аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, не кодируемых генетическим кодом, аминокислот, не встречающихся в природе, и искусственных аминокислот.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах по настоящему изобретению могут быть определены методиками, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез или мутагенез методом аланинового сканирования (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия могут также быть определены физическим анализом структуры такими методиками, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутациями аминокислот предполагаемых контактных сайтов. См., например: de Vos *et al.*, Science 255:306-12, 1992; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Природу незаменимых аминокислот можно также предположить, исходя из анализа гомологии с родственными компонентами (например, транслокационными или протеазными компонентами) полипептидов по настоящему изобретению.

Множественные аминокислотные замены могут быть проведены и проанализированы с применением известных методов мутагенеза и скрининга, таких как раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989). Кратко, эти авторы описывают методы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбор функциональных полипептидов с последующим секвенированием мутантных полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие методы, которые могут быть применены, включают фаговый дисплей (например: Lowman *et al.*, Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner *et al.*, патент США № 5,223,409; Huse, WIPO-публикация WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire *et al.*, Gene 46:145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7:127, 1988).

Множественные аминокислотные замены могут быть проведены и проанализированы с применением известных методов мутагенеза и скрининга, таких как раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989). Кратко, эти авторы описывают методы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбор функциональных полипептидов с последующим секвенированием мутантных полипептидов для определения спектра допустимых замен в каждом положении. Другие методы, которые могут быть применены, включают фаговый дисплей (например: Lowman *et al.*, Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner *et al.*, патент США № 5,223,409; Huse, WIPO-публикация WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire *et al.*, Gene 46:145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7:127, 1988).

Информация о последовательностях

HCDR1 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:1)

YQTMW

HCDR2 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:2)

VIGKTNENIAYADSVKG

HCDR3 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:3)

EWMDHSRPYYYYGMDV

LCDR1 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:4)

SGHNLEDKFAS

LCDR2 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:5)

RDDKRPS

LCDR3 MEDI1814/Abet0380-GL и Abet0380 (SEQ ID NO:6)

SSQDTVTRV

VH Abet0380 (SEQ ID NO:7) (CDR выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASMGNFNYQTMWWVRQAPGRGLEWVSVIGK
TNENIAYADSVKGRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEWMDHSRPYY
YYGMDVWGQGLTVTVSS

VL Abet0380 (SEQ ID NO:8) (CDR выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHNLEDKFASWYQQKPGQSPVLVIYRDDKRPS
 GIPERFSASNSGHTATLTISGTQATDEADYYCSSQDTVTRVFGGGTKLTVL

VH MEDI1814/Abet0380-GL (SEQ ID NO:9) (CDR выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASMGNFNYQTMWWRQAPGKGLEWVSVIGK
TNENIAYADSVKGRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWMDHSRPYY
YYGMDVWGQGLTVTVSS

VL MEDI1814/Abet0380-GL (SEQ ID NO:10) (CDR выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHNLEDKFASWYQQKPGQSPVLVIYRDDKRPS
 GIPERFSASNSGHTATLTISGTQAMDEADYYCSSQDTVTRVFGGGTKLTVL

Типичная аминокислотная последовательность A β 1-42 (SEQ ID NO:11)

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Типичная аминокислотная последовательность NfL (SEQ ID NO:12)

MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAISSYSAPVSSSLSVRRS
 YSSSSGSLMPLENLDLSQVAAISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHELEQ
 QNKVLEAELLVLRQKHSEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLEE
 TLRNLQARYEEEEVLSREDAEGRLMEARKGADEAALARAELEKRIDSLMDEISFLKKV
 HEEEIAELQAQIQYAQISVEMDVTKPDLSAALKDIRAQYEKLAAKNMQNAEEWFKS
 RFTVLTESAAKNTDAVRAAKDEVSESRLLKAKTLEIEACRGMNEALEKQLQELED
 KQNADISAMQDTINKLENELRTTKSEMARYLKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLLEG
 EETRLSFTSVGSITSGYSQSSQVFGRSAYGGLQTSSYLMSTRSFPSYYTSHVQEE
 QIEVEETIEAAKAEAAKDEPPSEGEAEEEEKDKKEAEEEEAAEEEEAAKEESEEAKE
 EEEGGEGEGEETKEAEEEEKKEGEGEEQAACKKD

Далее изобретение будет проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами. Последующие примеры иллюстрируют конкретные воплощения изобретения и различное их применение. Они описаны исключительно в пояснительных целях, и их не следует трактовать как какое-либо ограничение объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Фармакокинетика и метаболизм лекарственного средства у животных

Фармакокинетика (ФК) и токсикокинетика (ТК) MEDI1814 оценивали у крыс Спрег-Доули, мышей C57BL/6 и яванских макаков.

После 14-кратного введения крысам Спрег-Доули в дозах 10 мг/кг, внутривенно (в/в), 100 мг/кг, в/в, или 75 мг/кг, подкожно (п/к), один раз в неделю, MEDI1814

продемонстрировало линейную и дозопропорциональную ТК (данные не показаны). Было отмечено дозозависимое повышение, до 36 раз, уровней общего Аβ42 в ЦСЖ по сравнению с контрольной группой / группой наполнителя. Почти у всех животных из групп введения активного препарата уровни свободного Аβ42 в ЦСЖ были ниже нижней границы количественного определения (LLOQ).

После 14-кратного введения яванским макакам, в дозах 10 мг/кг, в/в, 100 мг/кг, в/в, или 75 мг/кг, п/к, один раз в неделю, MEDI1814 продемонстрировало линейную и дозопропорциональную ТК после первого введения, а после последнего введения рост ТК-экспозиции был несколько больше дозопропорционального (данные не показаны). Во всех группах введения концентрация MEDI1814 в ЦСЖ отдельных животных варьировала от 0,01% до 0,1% его концентрации в сыворотке. В фазе введения было отмечено дозозависимое повышение общего Аβ42 в плазме, до 2057 раз, и общего Аβ42 в ЦСЖ, до 7,7 раз, что указывает на связывание с мишенью. При всех дозах в конце фазы введения было достигнуто почти полное подавление (на 95% или более) свободного Аβ42 в ЦСЖ.

Специфичность связывания MEDI1814 исключительно с Аβ42 была подтверждена отсутствием эффекта на Аβ40 в ЦСЖ (данные не показаны).

В проанализированных когортах крыс и яванских макаков органов-мишеней токсичности выявлено не было (данные не показаны).

Пример 2. Однократное введение MEDI1814 в нарастающей дозе (SAD) и многократное введение MEDI1814 в нарастающей дозе (MAD) для лечения БА

Для оценки безопасности и переносимости MEDI1814 в сравнении с плацебо у субъектов с легкой или среднетяжелой БА, а также для оценки фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и иммуногенности MEDI1814 у субъектов с легкой или среднетяжелой БА авторы изобретения разработали многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, перемежающееся исследование с однократным и многократным введением в нарастающей дозе у субъектов в возрасте от 55 до 85 лет с легкой или среднетяжелой БА.

В данное исследование с однократным и многократным введением в нарастающей дозе были включены субъекты мужского пола и субъекты женского пола в постменопаузе или после хирургической стерилизации с легкой или среднетяжелой БА в возрасте от 55 до 85 лет (включительно). Критерии включения включали следующее.

- Индекс массы тела (ИМТ) от 17 до 32 кг/м² и масса тела от 50 до 120 кг включительно.

- Показатель 4 или менее по шкале Хачинского для оценки ишемии в модификации Розена.

- Легкая или среднетяжелая БА по критериям National Institute on Aging's Alzheimer's Association (NIA-AA), исходя из анамнеза пациента и оценки на месте, при условии, что когнитивные и функциональные симптомы вероятной БА присутствовали за 6 месяцев до рандомизации.

- Показатель MMSE от 16 до 26, включительно только при скрининге.

- МРТ в периоде скрининга, результаты которой соответствуют диагнозу деменции вследствие БА, то есть не указывают на иную этиологию деменции, такую как тяжелое поражение белого вещества (что указывает на сосудистую деменцию), как определено при централизованной оценке МРТ.

- Для исследования субъектов с биомаркерными признаками амилоидоза в когорты MAD были включены только субъекты с БА и уровнем Аβ(1-42) в ЦСЖ менее 550 пг/мл или нг/л при скрининге (при применении твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), предназначенного для использования исключительно в научно-исследовательских целях (Research Use Only, RUO) от Innogenetics), что указывает на большое количество амилоидных бляшек.

- Субъект и лицо, осуществляющее уход, или информатор (для субъектов с легкой или среднетяжелой БА) должны быть способны читать, писать и бегло разговаривать на английском, испанском или корейском языке.

- Субъект должен, по мнению исследователя, быть психически и физически способен понимать и принимать участие во всех запланированных обследованиях, а также завершить все необходимые тесты и процедуры, включая МРТ головного мозга и люмбальные пункции.

- По мнению исследователя, субъект и лицо, осуществляющее уход, или информатор (для субъектов с легкой или среднетяжелой БА) с высокой долей вероятности будут соблюдать протокол исследования и завершат исследование.

- У субъекта должен быть надежный информатор (например, супруг/супруга) или лицо, осуществляющее уход, с которым поддерживается регулярный контакт (например, не реже 3 раз в неделю; допустимо сочетание личных визитов и контакта по телефону). Тот же информатор или то же лицо, осуществляющее уход, должны участвовать в

каждом визите в рамках исследования и должны взаимодействовать с субъектом в степени, достаточной для предоставления содержательной информации при обследованиях, предусмотренным исследованием. Доказательства этого должны присутствовать в первичной документации.

- Субъекты должны понимать суть исследования и должны поставить подпись и дату в письменном информированном согласии до начала каких-либо процедур, связанных с исследованием. Субъекты, признанные неспособными дать информированное согласие, могут быть включены в исследование, если была получена ФИС с датой и подписью законного представителя субъекта в соответствии с местными законами и нормативными документами.

Критерии исключения включали следующее.

- Любое медицинское состояние, отличное от болезни Альцгеймера, которое могло бы объяснить или внести вклад в развитие деменции у субъекта, включая лобно-височную деменцию, болезнь телец Леви, сосудистую деменцию, болезнь Гентингтона или сопутствующую болезнь Паркинсона, синдром Дауна, посттравматические состояния, рассеянный склероз, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) или другое двигательное расстройство или активные аутоиммунные или нейроиммунологические расстройства, приводящие к деменции или нарушению когнитивных функций.

- Определенные признаки при скрининговой МРТ: более 4 микрокровоизлияний; инфаркт или внутримозговое (макро)кровоизлияние диаметром более 1 см; более 4 лакунарных инфарктов; поверхностный сидероз; аневризма; артериовенозная сосудистая мальформация; признаки ушиба головного мозга, энцефаломалиция; объемное образование; при этом окончательное решение о соответствии пациента этим критериям принимается при централизованной оценке МРТ. В случае наличия других несосудистых аномалий в головном мозге (например, опухоли головного мозга, гидроцефалии) этих субъектов исключали из исследования, если, по мнению исследователя (после консультации со спонсором в случае необходимости), эти аномалии могли способствовать когнитивным или функциональным расстройствам, имевшимся у пациента, снижать его способность к полноценному участию в исследовании или повышать риск кровотечения.

Исходя из данных, полученных в когортах SAD у субъектов с легкой или среднетяжелой БА, MEDI1814 можно также изучать у здоровых субъектов пожилого

возраста. В когорту здоровых субъектов пожилого возраста (SAD) могут быть включены только субъекты с Аβ(1-42) в ЦСЖ более 550 пг/мл или нг/л при скрининге (при применении твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), предназначенного для использования исключительно в научно-исследовательских целях (RUO) от Innogenetics), что указывает на отсутствие амилоидоза.

Демографические данные пациентов показаны в Таблице 2.

Чтобы минимизировать риск для субъектов, сначала проводили и анализировали однократное введение в нарастающей дозе, а перед переходом от когорты одной дозы к когорте более высокой дозы и перед многократным введением (MAD) проводили анализ данных по безопасности, переносимости и ФД.

SAD-часть исследования состоит из периода скрининга продолжительностью до 49 суток (7 недель), однократного введения MEDI1814 или плацебо и периода последующего наблюдения, в общей сложности приблизительно 113 суток.

Для наращивания дозы при в/в введении использовали пять когорт SAD (25 мг, 100 мг, 300 мг, 900 мг, 1800 мг). Начальная доза в этом первом исследовании у человека (first time in human, FTIH) была приблизительно в 8 раз ниже максимальной рекомендованной начальной дозы (maximum recommended starting dose, MRSD). MRSD была определена, исходя из NOAEL 100 мг/кг, в/в, в доклинических исследованиях у яванских макаков (не показано). MRSD составляет 3,2 мг/кг (или 192 мг), рассчитано с применением коэффициента аллометрического масштабирования 3,1 и коэффициента безопасности 10 к NOAEL (100 мг/кг, в/в). С учетом результатов исследований токсичности у яванских макаков, при начальной дозе 25 мг резерв безопасности составляет 446 (по C_{max}) и 189 (по AUC). У крыс были определены резервы безопасности, сопоставимые с резервами безопасности у яванских макаков. Резерв безопасности для введения человеку основан на экспозиции, достигнутой у яванских макаков, по следующим причинам: при сопоставимой экспозиции ни у одного из видов не было отмечено токсичности; приблизительно до 33% крыс в группах введения были ADA-положительны, что влияло на ТК-экспозицию; у яванских макаков было получено больше данных по ФК и ФД.

Таблица 2: Демографические данные и распределение пациентов

	Однократное введение [N = 45 (всего)]							Множественное введение [N = 32 (всего)]				
	Плацебо	MED1814 (N = 33)						Плацебо	MED1814 (N = 24)			
	N = 12	25 мг, в/в N = 3	100 мг, в/в N = 6	300 мг, в/в N = 6	900 мг, в/в N = 6	1800 мг, в/в N = 6	100 мг, п/к N = 6	N = 8	300 мг, в/в N = 6	900 мг, в/в N = 6	1800 мг, в/в N = 6	200 мг, п/к N = 6
Возраст (средний, годы)	66,3	74,0	66,8	69,0	71,8	64,8	69,3	70,0	71,7	70,8	62,5	69,3
Женщины:мужчины	7:5	0:3	6:0	5:1	4:2	1:5	3:3	5:3	3:3	2:4	3:3	5:1
Белые:черные:азиаты	10:1:1	1:0:2	6:0:0	4:1:1	5:0:1	6:0:0	5:0:1	8:0:0	5:0:1	6:0:0	6:0:0	5:1:0
Латиноамериканцы: да:нет	8:4	0:3	5:1	4:2	1:5	6:0	1:5	5:3	5:1	5:1	6:0	6:0
ИМТ (средний, кг/м ²)	26,8	27,1	28,2	27,2	25,0	27,6	27,8	27,9	31,2	26,2	28,0	30,1
MMSE (средний)	21,8	22,0	22,3	22,5	22,2	21,0	23,2	22,1	19,8	20,2	20,0	22,5
		~ 40% - ApoE ε4							~ 37% - ApoE ε4			

Схема однократного в/в введения в нарастающей дозе 25, 100, 300, 900 и 1800 мг MED1814 была разработана для достижения уровней дозы, позволяющих обеспечить более сильное и продолжительное снижение мишени в плазме и ЦСЖ при сохранении адекватного резерва безопасности. Выбранный диапазон доз был основан на предполагаемом снижении свободного Aβ-42 и существенных резервах безопасности относительно NOAEL.

После скрининга и включения в исследование, на 1 сутки, после проведения исходных процедур и обследований, предусмотренных до введения препарата (данные не показаны), тем субъектам, которые соответствовали критериям отбора, проводили однократную инфузию MED1814 или плацебо двойным слепым образом. В когорте SAD проводили однократное подкожное (п/к) введение в дозе 100 мг. Все обследования и сбор образцов в когорте SAD с п/к введением проводили так же, как в когортах с в/в введением.

После введения на 1 сутки оценивали безопасность и переносимость и отбирали образцы крови для анализа фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и биомаркеров в определенных временных точках до 24 часов после инфузии. До выписки субъекты оставались в отделении клинических исследований (CRU) на протяжении по меньшей мере 24 часов после инфузии. Дополнительную оценку безопасности и переносимости с забором образцов крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) проводили в определенных временных точках до конца периода наблюдения.

Для оценки безопасности и переносимости применяли стандартные обследования, включая нежелательные явления (НЯ), физикальное и неврологическое обследование, показатели жизненно важных функций, оральную температуру, частоту дыхания, массу тела, нецифровую и цифровую ЭКГ в 12 отведениях, телеметрию и клиничко-лабораторные анализы. Кроме того, были включены обследования на предмет безопасности и переносимости, специфические для лекарственных средств, которые могут оказывать психиатрические эффекты, например, C-SSRS и MMSE, а также МРТ-обследование на предмет безопасности, специфическое для лекарственных средств, приводящих к потенциальному риску вазогенного отека.

Исследование включало частый сбор образцов для анализа ФК MEDI1814 при однократном и многократном введении.

С целью получения информации, необходимой для подбора доз в этом и будущих исследованиях, были включены обследования для оценки ФД, в том числе определение уровней Аβ(1-42) в плазме и ЦСЖ и изучение взаимосвязи уровней Аβ и ФК MEDI1814.

Может быть включена необязательная когорта здоровых субъектов пожилого возраста для исследования ФК- и ФД-эффектов MEDI1814 в здоровой популяции и их сравнения с его ФК- и ФД-эффектами у пациентов с легкой или среднетяжелой БА. Обычно введение препарата в этой когорте будут начинать, если ФК/ФД-эффекты в когортах с БА будут отличаться от предполагаемых. В таком случае, анализ ФК/ФД у здоровых субъектов пожилого возраста позволит получить информацию о степени связывания с мишенью и эффекте амилоидоза на фармакодинамику.

МРТ головного мозга как часть мониторинга безопасности проводили при скрининге и через 5 недель после инфузии.

Люмбальную пункцию для анализа фармакокинетических (ФК) параметров и фармакодинамических (ФД) биомаркеров в ЦСЖ проводили в когортах SAD при скрининге (1 сутки) и через 4 недели после инфузии (29 сутки).

Часть исследования с многократным введением в нарастающей дозе (multiple ascending dose, MAD) состоит из периода скрининга продолжительностью до 49 суток (7 недель), периода введения продолжительностью 8 недель и периода последующего наблюдения, в общей сложности приблизительно 169 суток.

Были использованы три когорты MAD с в/в введением в нарастающей дозе. В периоде введения каждому субъекту проводили три инфузии MEDI1814 или плацебо, при этом все инфузии были разделены интервалом продолжительностью 4 недели

(Q4W). MAD начинали только после получения достаточных данных по безопасности, переносимости, ФК и Аβ(1-42) в ЦСЖ в когортах SAD. Для начала MAD необходимо выполнение следующих условий.

1. Предполагаемая экспозиция в стационарном состоянии на первом уровне дозы в MAD-исследовании не превышает предполагаемую максимальную экспозицию, достигнутую ранее при однократном введении, и признана безопасной и переносимой при SAD.

2. Ни одна из панелей, использованных ранее при SAD, не соответствовала критериям прекращения наращивания дозы.

3. Возможность введения в дозе, приводящей к концентрации MEDI1814 в сыворотке, которая предположительно будет снижать Аβ(1-42) в ЦСЖ более чем на 30%.

Решение о переходе от когорты одной дозы к следующей когорте более высокой дозы принимали после проведения третьей инфузии по меньшей мере у 6 субъектов из данной когорты.

После скрининга и включения в исследование, на 1 сутки, после проведения исходных процедур и обследований, предусмотренных до введения препарата, тем субъектам, которые соответствовали критериям отбора, проводили однократную инфузию MEDI1814 или плацебо двойным слепым образом. Оценивали безопасность и переносимость и отбирали образцы крови для анализа ФК- и ФД-биомаркеров в определенных временных точках до 24 часов после инфузии. До выписки субъекты оставались в CRU на протяжении по меньшей мере 24 часов после инфузии.

На 4, 8, 15, 22 и 29 сутки субъекты возвращались в CRU для оценки безопасности и забора образцов крови. Вторую и третью инфузию MEDI1814 или плацебо проводили на 29 сутки и 57 сутки, соответственно, после проведения обследований, предусмотренных до введения. После второй и третьей инфузии субъекты оставались в CRU на протяжении по меньшей мере 4 часов. У всех субъектов проводили оценку безопасности, забор образцов крови и ЦСЖ в определенных временных точках в периоде введения и до конца периода наблюдения. МРТ головного мозга как часть мониторинга безопасности проводили при скрининге и через 5 недель после последней инфузии.

Люмбальную пункцию для анализа ФК-параметров и ФД-биомаркеров в ЦСЖ проводили при скрининге (1 сутки) и через 4 недели после последней инфузии.

В дополнительной когорте MAD проводили п/к инъекцию MEDI1814 в дозе 200 мг. Все обследования и сбор образцов проводили так же, как в когортах с в/в введением.

Расчет или вывод фармакокинетических переменных

Данные по концентрации MEDI1814 и сводная статистика включали такие переменные, как N, среднее, стандартное отклонение, медиану, максимум, минимум, коэффициент вариации и среднее геометрическое. Будут построены индивидуальные и усредненные профили концентрации MEDI1814 по времени, и они будут включены в отчет.

С применением некомпартментного анализа и Phoenix® WinNonlin® v6.2 (или более поздней версии) определяли следующие параметры ФК MEDI1814.

SAD-часть

Максимальная концентрация в сыворотке (C_{max}), время достижения C_{max} (t_{max}), минимальная концентрация в сыворотке (C_{min}), терминальный период полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нуля до последней измеримой концентрации (AUC_{0-t}) и от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), процент AUC, полученный экстраполяцией (%AUC_{ex}), клиренс (CL) и объем распределения в терминальной фазе (V_z).

MAD-часть

Первое введение: максимальная концентрация в сыворотке (C_{max}), время достижения C_{max} (t_{max}), минимальная концентрация в сыворотке (C_{min}) и площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени за первый интервал введения ($AUC_{0-\tau}$).

Третье введение: максимальная концентрация в сыворотке (C_{max}), время достижения C_{max} (t_{max}), минимальная концентрация в сыворотке (C_{min}), терминальный период полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени за интервал введения ($AUC_{0-\tau}$), клиренс (CL), объем распределения в терминальной фазе (V_z), объем распределения в стационарном состоянии (V_{ss}) и коэффициенты накопления.

Результаты по иммуногенности анализировали описательно, получая сводные данные о числе и проценте субъектов с выявляемыми ADA к MEDI1814. Для образцов с подтвержденным положительным результатом на наличие ADA будет приведен титр

иммуногенности. Оценивали эффект иммуногенности на ФК, фармакодинамику и безопасность.

Определяли следующие ФД-параметры. Получали индивидуальные и средние профили биомаркеров в плазме и ЦСЖ (общий A β (1-40), общий и свободный A β (1-42) и олигомеры A β), а также их изменение относительно исходного уровня (1 сутки, до введения). Определяли такие переменные, как N, среднее, стандартное отклонение, медиана, максимум, минимум, коэффициент вариации и среднее геометрическое. ФД-параметры могут быть выведены на основе одного или более чем одного биомаркера с применением, по необходимости, некомпартментных методов. ФД-расчеты могут быть проведены с использованием Phoenix® WinNonlin® v6.2 (или более поздней версии) или SAS® версии 8.2 или более поздней версии.

Также оценивали следующие MCIS-переменные: Memory Performance Index (диапазон 0-100), Recall Pattern (варьирует от «ниже нормы» до нормы), Immediate Recall Total (диапазон 0-30), Delayed Recall Estimate (диапазон 0-10), Delayed Free Recall (диапазон 0-10), Delayed Cued Recall Yes (диапазон 0-10), Delayed Recall No (диапазон 0-10) и Animal Recall (диапазон 0-9).

Результаты

Плацебо или MEDI1814 в дозах до 1800 мг однократно или многократно (в/в и п/к) были введены 77 пациентам с БА.

MEDI1814 продемонстрировало убедительный профиль безопасности и хорошую переносимость как при в/в, так и при п/к введении во всех когортах SAD и MAD. По нежелательным явлениям (НЯ) очевидных дозозависимых тенденций не было. Существенных нежелательных явлений (СНЯ) отмечено не было. Все отмеченные НЯ были легкими или умеренными по степени выраженности. Серьезных нежелательных явлений (СНЯ), случаев прекращения участия в исследовании вследствие нежелательных явлений или летальных исходов отмечено не было.

Во время последующего наблюдения не было клинически значимых изменений показателей жизненно важных функций, электрокардиографических параметров, лабораторных результатов или результатов физикального и неврологического обследования. После введения препарата не было признаков ухудшения когнитивных функций (данные MMSE, не показаны) или суицидных мыслей или поведения (данные по шкале Колумбийского университета для оценки степени выраженности суицидальных намерений (Columbia-Suicide Severity Rating Scale), не показаны).

Важно, что при магнитно-резонансной томографии (МРТ) не было выявлено никаких случаев визуализационных аномалий, связанных с амилоидом, ни применительно к развитию отека (ARIA-E), ни применительно к отложению гемосидерина (ARIA-H). В рамках исследования ни у одного субъекта не было выявлено противолечарственных антител, которые могли бы указывать на иммуногенность (все титры менее 50).

Пример 3. Эффект введения MEDI1814 на уровни свободного Аβ1-42, общего Аβ1-42 и общего Аβ1-40 в ЦСЖ

Уровень свободного Аβ1-42, общего Аβ1-42 и общего Аβ1-40 в ЦСЖ определяли на 29 сутки после введения в когортах SAD по Примеру 2 и на 85 сутки после введения в когортах MAD.

На 29 сутки после однократного введения MEDI1814 наблюдали дозозависимое снижение свободного Аβ1-42 и повышение общего Аβ1-42 в ЦСЖ, профиль соответствовал антитело-опосредованному связыванию мишени Аβ1-42 в центральном компартменте (Фиг. 1, верхняя диаграмма). В когортах наиболее высоких доз (300-1800 мг, в/в) свободный Аβ1-42 в ЦСЖ был снижен приблизительно на 90% (медиана), но при меньших дозах снижение было менее выраженным: -72% (100 мг, в/в), -11% (100 мг, п/к), -34% (25 мг, в/в); и плацебо (-8%) (Фиг. 1, верхняя диаграмма). Наблюдаемый профиль свободного Аβ1-42 в ЦСЖ при анализируемом диапазоне доз MEDI1814 в значительной степени соответствовал прогнозам с применением ФК/ФД-модели, основанной на данных, полученных у яванских макаков. Несмотря на то, что в диапазоне доз от 25 до 300 мг, в/в, наблюдаемая степень снижения свободного Аβ1-42 была больше ожидаемой, после в/в введения в дозах 900 мг и 1800 мг была отмечена почти максимальная степень снижения, как и предполагалось (Фиг. 1, верхняя диаграмма).

Как и ожидалось, при более высоких дозах наблюдали существенное повышение свободного Аβ1-42: +273% (медиана, 1800 мг, в/в), +323% (900 мг, в/в), +135% (300 мг, в/в), в сравнении с +0,2% для плацебо (Фиг. 1, средняя диаграмма). Во всем диапазоне доз различия между MEDI1814 и плацебо по проценту изменения свободного Аβ1-42 в ЦСЖ относительно исходного уровня варьировали от -27% до -124%, и от +13% до +332% для общего Аβ1-42 (Фиг. 1, верхняя и средняя диаграммы, соответственно). Тем не менее, в соответствии с известной селективностью MEDI1814 в отношении Аβ1-42, существенных изменений уровней общего Аβ1-40 в ЦСЖ относительно исходного

уровня или различий между MEDI1814 и плацебо по Аβ1-40 отмечено не было (Фиг. 1, нижняя диаграмма).

В когортах MAD с многократным введением MEDI1814 на 85 сутки наблюдали сопоставимый дозозависимый ответ по ЦСЖ-биомаркерам. Снижение свободного Аβ1-42 в ЦСЖ составляло -4% (медиана, плацебо), -50% (300 мг, в/в), -67% (200 мг, п/к) и приблизительно -95% при в/в введении MEDI1814 в дозах 900 и 1800 мг MEDI1814 (Фиг. 1, верхняя диаграмма). Наблюдаемый профиль снижения свободного Аβ1-42 в ЦСЖ полностью соответствовал ФК-ФД-профилю, спрогнозированному с применением данных, полученных у яванских макаков (данные не показаны). В отличие от этого, во всем диапазоне доз MEDI1814 наблюдали повышение общего Аβ1-42 в ЦСЖ, составлявшее приблизительно +70-800% (медиана), по сравнению с приблизительно -30% для плацебо (Фиг. 1, средняя диаграмма). Профиль снова нашел отражение в различиях MEDI1814 и плацебо по изменению свободного Аβ1-42 (приблизительно -90% при дозах 900 мг и 1800 мг, в/в) и общего Аβ42 (приблизительно +860% при дозе 1800 мг, в/в) относительно исходного уровня (Фиг. 1, верхняя и средняя диаграммы, соответственно). Схема с многократным введением дополнительно подтвердила отсутствие каких-либо существенных изменений в профиле общего Аβ1-40 в ЦСЖ после введения MEDI1814 (Фиг. 1, нижняя диаграмма).

ФК-свойства MEDI1814 при однократном и многократном введении (когорты SAD и MAD) соответствовали друг другу. Наблюдаемая сывороточная экспозиция была дозозависимой, и концентрации снижались двухфазным образом со сходными скоростями элиминации (эффективный средний период полувыведения из сыворотки приблизительно от 14 до 20 суток). Средний клиренс MEDI1814 в стационарном состоянии (57 суток после начала многократного введения) варьировал от 145 до 223 мл/сутки. Накопление MEDI1814 в сыворотке за рассматриваемый период было умеренным (от 0,75-кратного до 1,15-кратного по C_{max} и от 0,83- до 1,62-кратного по AUC; среднее по всем дозам). Медианное t_{max} в стационарном состоянии после многократного п/к введения составляло 14 суток. Биодоступность MEDI1814 после однократного п/к введения в дозе 100 мг составляла 33% (исходя из $AUC_{0-\infty}$ при использовании дозы 100 мг, в/в, как эталона). Как после однократного, так и после повторного введения, MEDI1814 поддавалось количественному определению в ЦСЖ при дозах 300 мг и более (не показано). Отношение концентрации в ЦСЖ к

концентрации в сыворотке варьировало от 0,09 до 0,3% после однократного введения и от 0,08 до 0,59% после многократного введения.

После однократного введения MEDI1814 в изученных дозах концентрации общего Аβ1-42 в плазме продемонстрировали высокую степень вариабельности. Тем не менее, по сравнению с введением плацебо все дозы MEDI1814 приводили к заметному повышению средних концентраций общего Аβ1-42 в плазме (не показано). Последующее снижение профилей общего Аβ1-42 в плазме согласовалось с соответствующими временными профилями концентрации MEDI1814 в сыворотке (не показано), и динамика концентраций общего Аβ1-42 до 113 суток была дозозависимой. Сходным образом, при многократном введении MEDI1814 профили общего Аβ1-42 в плазме следовали за соответствующими ФК-профилями (не показано). Наблюдаемое повышение общего Аβ1-42 в плазме было значительно больше, чем после однократного введения, что является отражением установленного накопления MEDI1814 при многократном введении.

Пример 4. Эффект введения MEDI1814 на уровни NfL, pTau, tTau и Ng в плазме и ЦСЖ

В когортах MAD по Примеру 2 уровни NfL, pTau, tTau и Ng в плазме и ЦСЖ определяли на 85 сутки после введения. Примененные анализы перечислены в Таблице 3.

После введения MEDI1814, 1800 мг, в/в, в когорте MAD уровень NfL в ЦСЖ был снижен, и при применении обоих методов анализа наблюдаемое снижение составляло приблизительно 50%. В когорте MAD, 1800 мг, в/в, уровень NfL в плазме был снижен, и наблюдаемое снижение превышало 20% (Фиг. 2). При сравнении с исходными уровнями, на 85 сутки после введения в когортах MAD наблюдали положительную корреляцию между уровнями NfL в плазме и ЦСЖ (Фиг. 3).

Ни в одной из когорт MAD не было значимых изменений уровня pTau₁₈₁ в ЦСЖ или плазме (Фиг. 4, верхняя и средняя диаграммы, соответственно). В отличие от этого, в когорте MAD, 1800 мг, в/в, наблюдали снижение уровня pTau₂₁₇ в плазме более чем на 25%.

Таблица 3: Анализы, примененные для количественного определения уровней NfL, pTau, tTau и Ng

Биомаркер	Среда	Метод	Лаборатория
Легкая цепь нейрофиламентов (NfL)	ЦСЖ	UmanDiagnostics (ELISA)	Гетеборгский университет
	ЦСЖ	SIMOA-HD1 (ELISA)	Lilly Research
	Плазма	SIMOA-HD1 (ELISA)	Laboratories
pTau ₁₈₁	ЦСЖ	Fujirebio INNOTEST PHOSPHO-TAU (ELISA)	Гетеборгский университет
	Плазма	Mesoscale Discovery Lilly P-tau181 (ELISA)	Lilly Research Laboratories
pTau ₂₁₇	Плазма	Mesoscale Discovery Lilly P-tau217 (ELISA)	Lilly Research Laboratories
tTau	ЦСЖ	Fujirebio INNOTEST hTAU Ag (ELISA)	Гетеборгский университет
Нейрогранин (Ng)	ЦСЖ	Анализ собственной разработки Гетеборгского университета (ELISA)	Гетеборгский университет

Ни в одной из когорт MAD не было значимых изменений уровня tTau в ЦСЖ (Фиг. 5, верхняя диаграмма).

В когортах MAD средний уровень Ng в СМЖ после в/в введения MEDI1814 несколько снижался (Фиг. 5, нижняя диаграмма), однако это не было статистически значимо.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения болезни Альцгеймера (БА) у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 ($A\beta 1-42$), пациенту, где связывающий элемент снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

2. Способ предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента, селективно связывающегося с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 ($A\beta 1-42$), пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения;

где связывающий элемент снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов (NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

3. Способ по п. 1 или 2, где связывающий элемент снижает уровень NfL в плазме пациента.

4. Способ по любому из п.п. 1-3, где связывающий элемент снижает уровень NfL в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациента.

5. Способ по любому из п.п. 1-4, где связывающий элемент снижает уровень NfL по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения указанного связывающего элемента.

6. Способ по любому из п.п. 1-5, где уровень NfL измеряют посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), возможно SIMOA-HD1.

7. Способ по любому из п.п. 1-6, где пациент положителен по амилоиду, где возможно пациент:

- (а) отрицателен по тау;
- (б) отрицателен по нейродегенерации;
- (в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации;
- (г) положителен по тау;
- (д) положителен по нейродегенерации;
- (е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации;

(ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или

(з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации.

8. Способ по п. 7, включающий определение того, что пациент положителен по амилоиду, и возможно определение того, что пациент:

(а) отрицателен по тау;

(б) отрицателен по нейродегенерации;

(в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации;

(г) положителен по тау;

(д) положителен по нейродегенерации;

(е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации;

(ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или

(з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации.

9. Способ по п. 7 или 8, где статус пациента как (1) положительного или отрицательного по амилоиду, (2) положительного или отрицательного по тау и/или (3) положительного или отрицательного по нейродегенерации определяют независимо на основании:

(а) ЦСЖ-маркера;

(б) плазменного маркера; и/или

(в) визуализационного маркера.

10. Способ по п. 9, где:

(а) (1) ЦСЖ-маркером амилоида является А β 1-42 в ЦСЖ, (2) ЦСЖ-маркером тау является фосфо-тау в ЦСЖ, и/или (3) ЦСЖ-маркером нейродегенерации является общий тау в ЦСЖ; и/или

(б) (1) визуализационным маркером амилоида является визуализация амилоида, (2) визуализационным маркером тау является визуализация тау, и/или (3) визуализационным маркером нейродегенерации является магнитно-резонансная томография или позитронно-эмиссионная томография с фтордезоксиглюкозой.

11. Способ по любому из п.п. 1-10, где связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим А β 1-42, представляет собой антитело.

12. Способ по п. 11, где антитело, селективно связывающееся с человеческим А β 1-42, связывается с А β 1-42 с константой диссоциации (K_D) 500 пМ или менее и либо не связывается с А β 1-40, либо связывается с А β 1-40 с K_D более 1 мМ.

13. Способ по п. 11 или 12, где антитело содержит:

(а) домен VH (вариабельной области тяжелой цепи), содержащий набор HCDR (гипервариабельный участок) MEDI1814, где аминокислотные последовательности HCDR Abet0380 представляют собой

HCDR1 SEQ ID NO:1,

HCDR2 SEQ ID NO:2,

HCDR3 SEQ ID NO:3,

или содержащий набор HCDR MEDI1814 с одной или двумя аминокислотными мутациями; и

(б) домен VL (вариабельная область легкой цепи), содержащий набор LCDR MEDI1814, где аминокислотные последовательности LCDR MEDI1814 представляют собой

LCDR1 SEQ ID NO:4,

LCDR2 SEQ ID NO:5,

LCDR3 SEQ ID NO:6,

или содержащий набор LCDR MEDI1814 с одной или двумя аминокислотными мутациями.

14. Способ по п. 13, где антитело содержит:

(а) (1) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 домена VH MEDI1814 или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10 домена VL MEDI1814 или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями; или

(б) (1) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 домена VH Abet0380, или ее вариант эмбрионального типа, или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями, и (2) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 домена VL Abet0380, или ее вариант эмбрионального типа, или аминокислотную последовательность, содержащую данную аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями.

15. Способ по любому из п.п. 11-14, где антитело содержит домены VH и VL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0380-GL, депонированной под регистрационным номером 41890.

16. Способ по любому из п.п. 11-15, где антитело представляет собой человеческий IgG, возможно человеческий IgG1 или человеческий IgG2.

17. Способ по п. 16, где антитело представляет собой человеческий IgG1-ТМ, IgG1-УТЕ или IgG1-ТМ-УТЕ.

18. Способ по любому из п.п. 11-17, где антитело вводят в дозе 200 мг или более, возможно, где антитело вводят в дозе приблизительно 200 мг, более предпочтительно в дозе приблизительно 300 мг, еще более предпочтительно в дозе приблизительно 900 мг или еще более предпочтительно в дозе приблизительно 1800 мг.

19. Способ по любому из п.п. 11-18, где антитело вводят с интервалами от 3,5 до 4,5 недель; возможно, где антитело вводят с интервалами 4 недели (Q4W).

20. Способ по любому из п.п. 1-19, где связывающий элемент вводят пациенту внутривенно или подкожно.

21. Способ по любому из п.п. 2-20, где нейрональное аксональное повреждение ассоциировано с болезнью Альцгеймера (БА), возможно БА в легкой или среднетяжелой форме, пресимптоматической стадией БА и/или легким когнитивным расстройством вследствие БА.

22. Способ по любому из п.п. 1-21, где связывающий элемент снижает уровень рTau217 у пациента по сравнению с уровнем рTau217 у пациента до введения связывающего элемента.

23. Способ по любому из п.п. 1-22, где связывающий элемент: (1) снижает уровень свободного A β 1-42 у пациента по сравнению с уровнем свободного A β 1-42 у пациента до введения связывающего элемента; и/или повышает уровень общего A β 1-42 у пациента по сравнению с уровнем общего A β 1-42 у пациента до введения связывающего элемента.

24. Способ по любому из п.п. 1-23, где связывающий элемент включен в фармацевтическую композицию.

25. Связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 (A β 1-42) для применения в способе предупреждения нейронального аксонального повреждения у пациента, включающем введение терапевтически эффективного количества связывающего элемента пациенту с нейрональным аксональным повреждением или риском нейронального аксонального повреждения, где связывающий элемент снижает уровень легкой цепи нейрофиламентов

(NfL) у пациента по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

26. Способ оценки эффективности способа лечения болезни Альцгеймера, как определено в любом из п.п. 1 и 3-24, или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, как определено в любом из п.п. 2-24, включающий определение уровня NfL у пациента до введения связывающего элемента и после введения связывающего элемента, где способ предупреждения нейронального аксонального повреждения является эффективным, если уровень NfL у пациента после введения связывающего элемента снижен по сравнению с уровнем NfL у пациента до введения связывающего элемента.

27. Способ по п. 26, где способ лечения болезни Альцгеймера или способ предупреждения нейронального аксонального повреждения являются эффективными, если уровень NfL в плазме пациента снижен после лечения связывающим элементом, возможно, где снижение уровня NfL в плазме представляет собой снижение по меньшей мере на 30%.

28. Способ по п. 26 или 27, где способ лечения болезни Альцгеймера или способ предупреждения нейронального аксонального повреждения являются эффективными, если уровень NfL в ЦСЖ пациента снижен после лечения связывающим элементом, возможно, где снижение уровня NfL в ЦСЖ представляет собой снижение по меньшей мере на 30%.

29. Способ определения того, что пациент является подходящим для способа лечения болезни Альцгеймера, как определено в любом из п.п. 1 и 3-24, или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, как определено в любом из п.п. 2-24, включающий оценку статуса пациента по амилоиду с использованием ЦСЖ-маркера, плазменного маркера и/или визуализационного маркера до введения связывающего элемента, и где пациента определяют как подходящего для способа лечения болезни Альцгеймера или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, если статус пациента по амилоиду положителен.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий оценку (1) статуса пациента по тау, (2) статуса пациента по нейродегенерации или (3) статуса пациента по тау и статуса пациента по нейродегенерации до введения связывающего элемента, где ЦСЖ-маркер и/или визуализационный маркер тау и/или нейродегенерации выбраны независимо, и где

пациент определен как подходящий для способа лечения болезни Альцгеймера или способа предупреждения нейронального аксонального повреждения, если пациент:

- (а) отрицателен по тау;
- (б) отрицателен по нейродегенерации;
- (в) отрицателен по тау и отрицателен по нейродегенерации;
- (г) положителен по тау;
- (д) положителен по нейродегенерации;
- (е) положителен по тау и положителен по нейродегенерации;
- (ж) положителен по тау и отрицателен по нейродегенерации; или
- (з) отрицателен по тау и положителен по нейродегенерации.

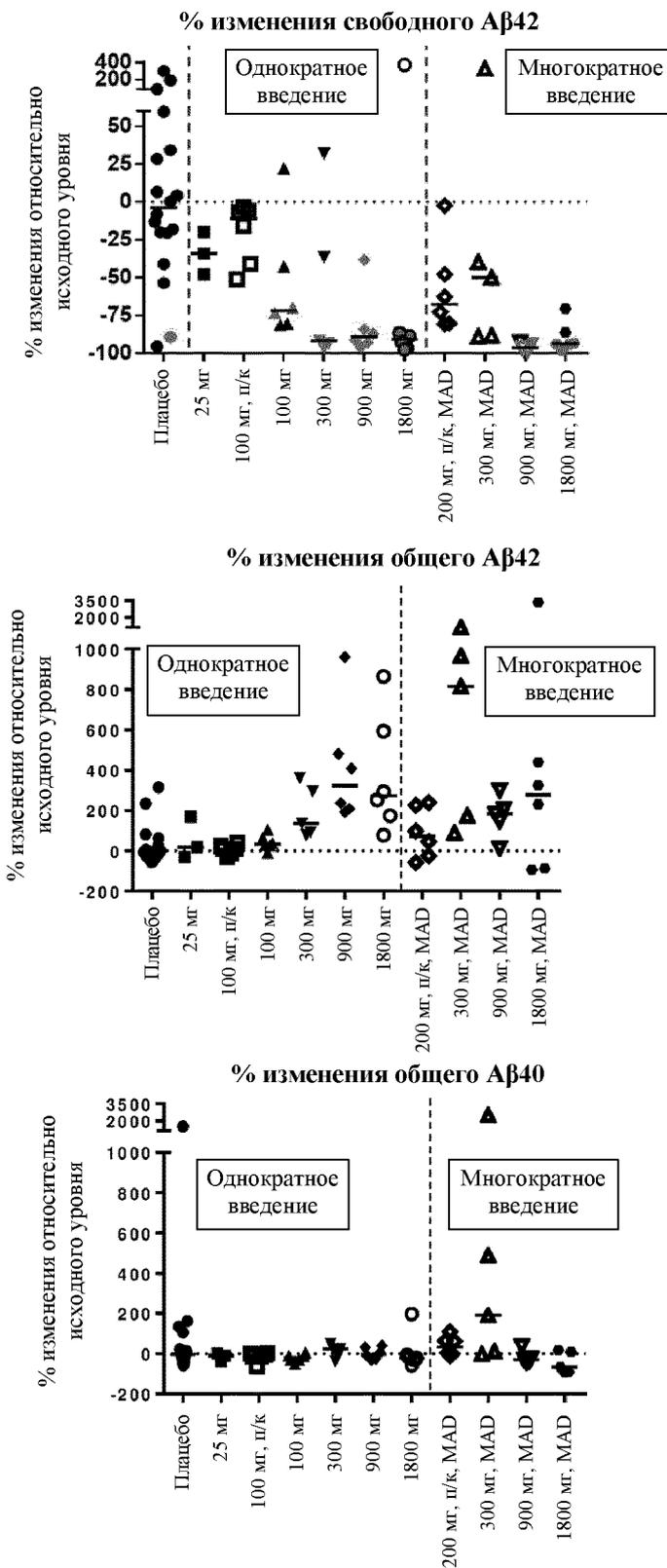
31. Способ по п. 29 или 30, где:

(а) (1) ЦСЖ-маркером амилоида является $A\beta 1-42$ в ЦСЖ, (2) ЦСЖ-маркером тау является фосфо-тау в ЦСЖ, и/или (3) ЦСЖ-маркером нейродегенерации является общий тау в ЦСЖ; и/или

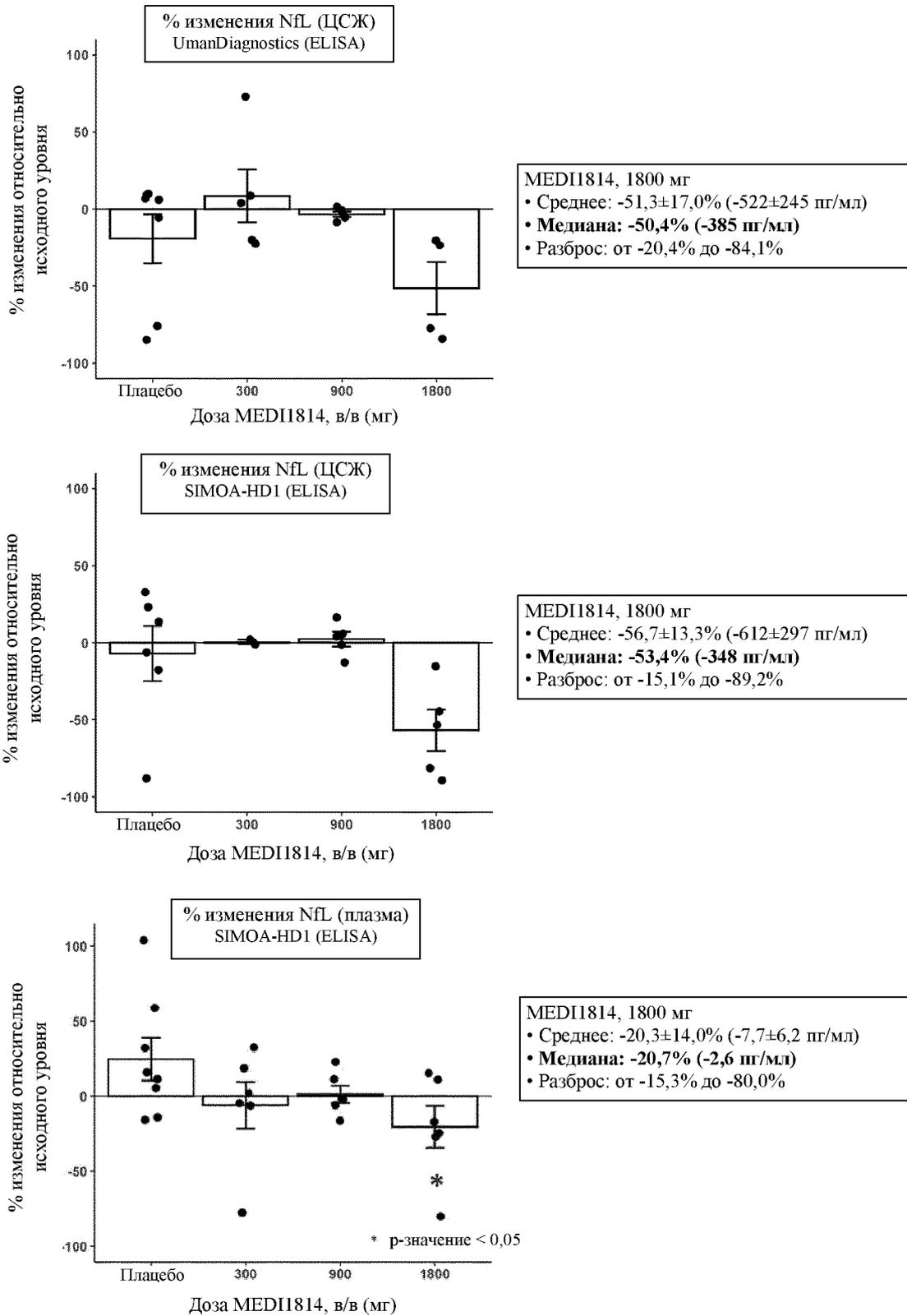
(б) (1) визуализационным маркером амилоида является визуализация амилоида, (2) визуализационным маркером тау является визуализация тау, и/или (3) визуализационным маркером нейродегенерации является магнитно-резонансная томография или позитронно-эмиссионная томография с фтордезоксиглюкозой.

32. Набор, содержащий: (1) связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 ($A\beta 1-42$); и (2) антитело, специфично связывающееся с NfL; где возможно связывающий элемент, селективно связывающийся с человеческим $A\beta 1-42$, представляет собой антитело, как определено в любом из п.п. 12-17.

ФИГ. 1

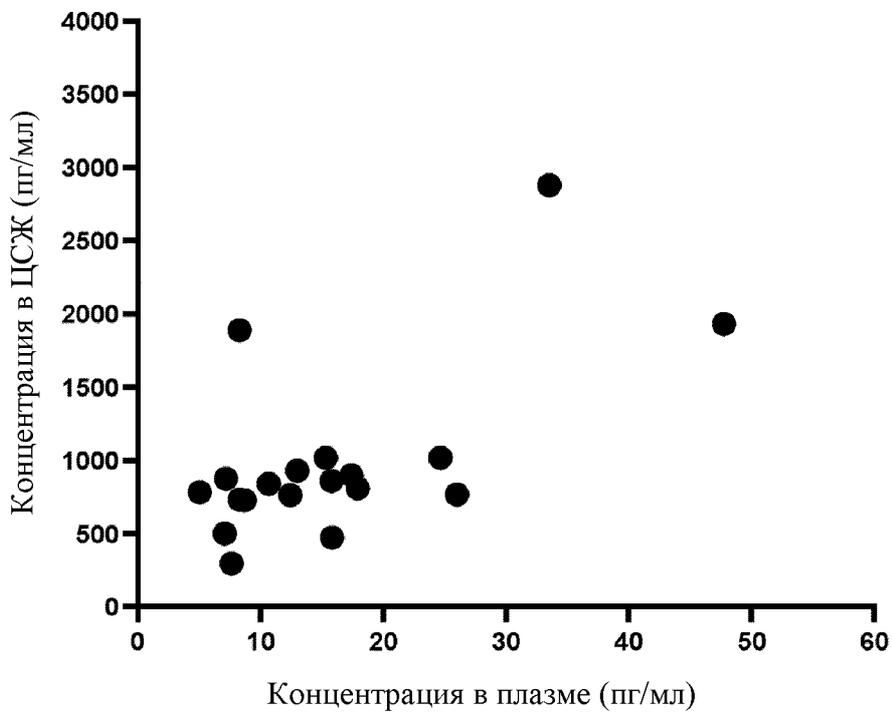


ФИГ. 2

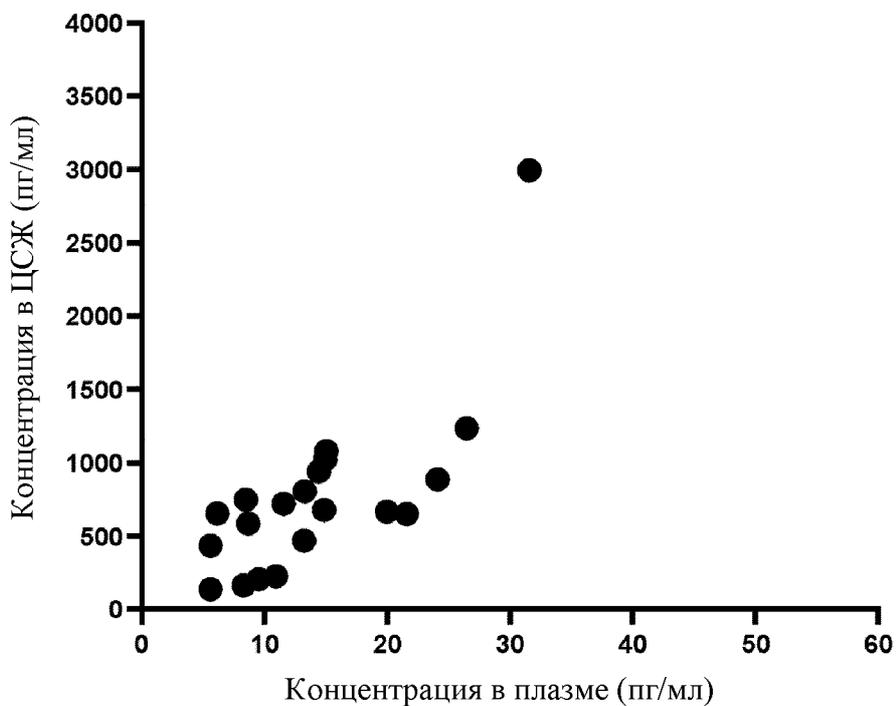


ФИГ. 3

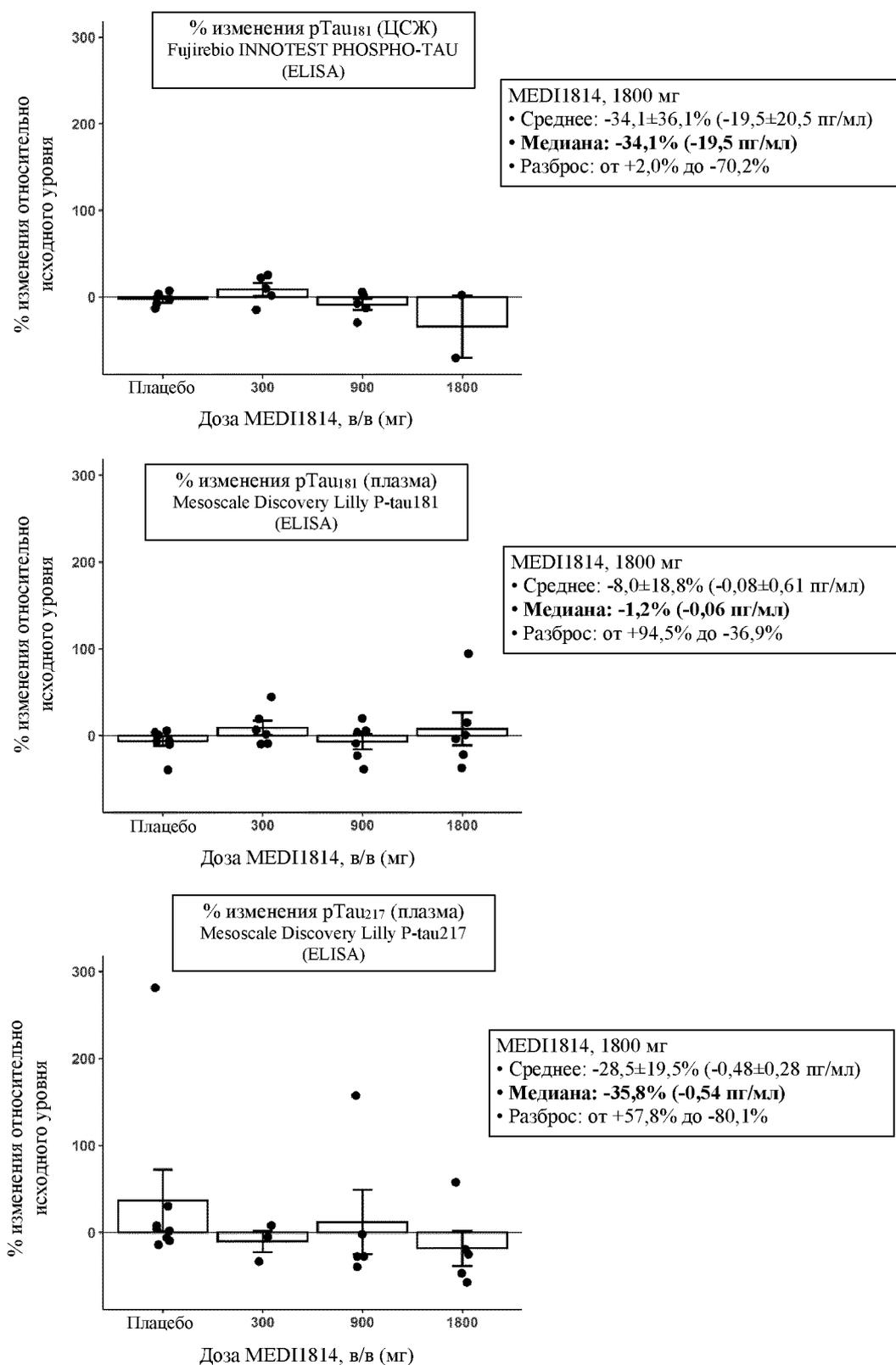
Корреляция NfL в плазме и ЦСЖ, исходно



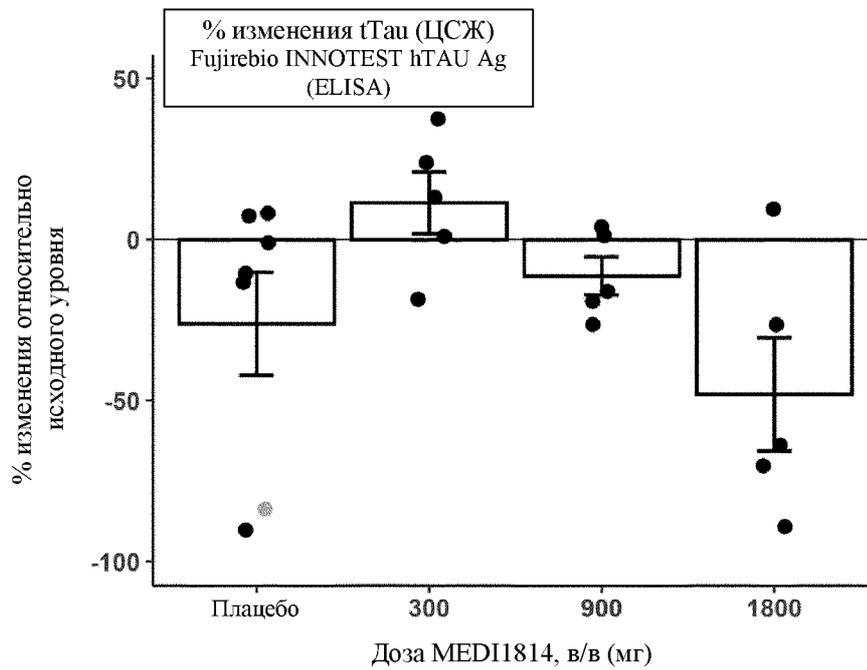
Корреляция NfL в плазме и ЦСЖ, в конечной точке



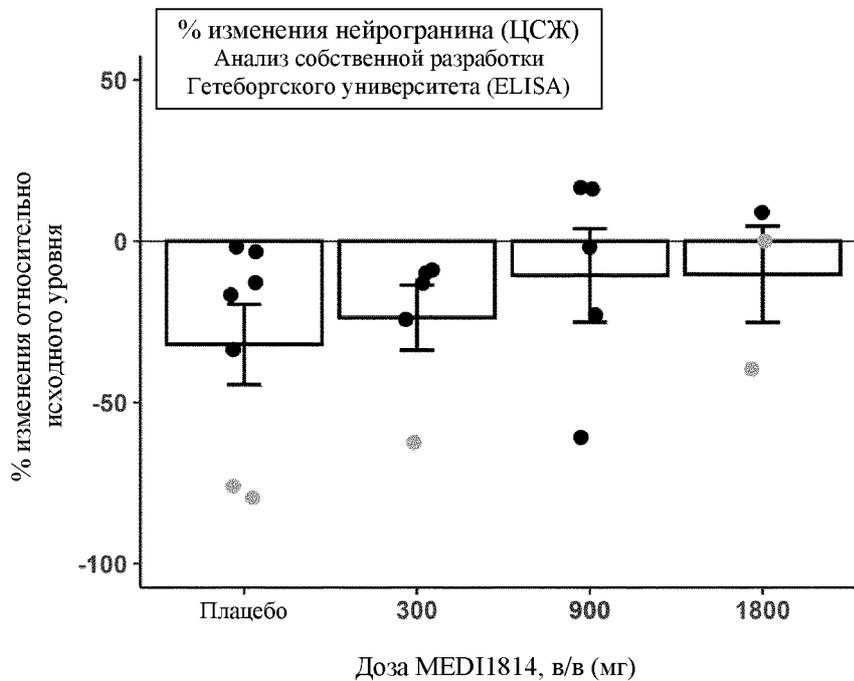
ФИГ. 4



ФИГ. 5



MEDI1814, 1800 мг
 • Среднее: $-48,0 \pm 17,6\%$ (-268 ± 145 пг/мл)
 • Медиана: $-63,8\%$ (-224 пг/мл)
 • Разброс: от $+9,6\%$ до $-89,1\%$



MEDI1814, 1800 мг
 • Среднее: $-10,2 \pm 14,9\%$ (-13 ± 37 пг/мл)
 • Медиана: $0,0\%$ (0 пг/мл)
 • Разброс: от $+9,0\%$ до $-39,6\%$