

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390331 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.06

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.23

(54) АНТИ-А β АНТИТЕЛА

(31) 63/055,813; 63/086,589; 63/187,379;
63/219,611

(72) Изобретатель:
Сков Майкл, Ниджар Тарлочан С.,
Говиндараджан Сридхар, Перселл
Том, Велч Марк, Бард Фредерик,
Барбур Робин, Заго Вагнер (US)

(32) 2020.07.23; 2020.10.01; 2021.05.11;
2021.07.08

(33) US

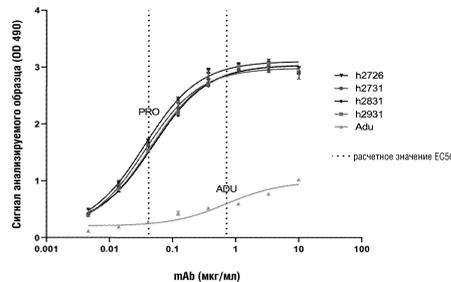
(86) PCT/US2021/042900

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2022/020680 2022.01.27

(71) Заявитель:
ОЗЕР ПРОТЕНА ЛИМИТЕД (IE)

(57) Представлены антитела, которые связывают человеческий бета-амилоидный пептид, способы детекции, измерения и лечения амилоидогенетических расстройств указанными антителами, фармацевтические композиции, содержащие антитела, и способы получения.



A1

202390331

202390331

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577169EA/032

АНТИ-АБЕТА АНТИТЕЛА

Родственная заявка

[001] Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной патентной заявки США № 63/055813, поданной 23 июля 2020 г., предварительной патентной заявки США № 63/086589, поданной 1 октября 2020 г., предварительной патентной заявки США № 63/187379, поданной 11 мая 2021 г., и предварительной патентной заявки США № 63/219611, поданной 8 июля 2021 г., все эти заявки включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

Представление перечня последовательностей

[002] Машиночитаемая форма Перечня последовательностей подана с настоящей заявкой в электронном виде и включена в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Перечень последовательностей содержится в файле, созданном 22 июля 2021 г., имеющем название файла “20-1030-WO_Sequence-Listing_ST25.txt” и размер 155 Кб.

Область техники, к которой относится изобретение

[003] Настоящее изобретение относится к антителам к бета-амилоиду (Аβ), а также к композициям и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

[004] Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой прогрессирующее заболевание, приводящее к сенильной деменции. Заболевание обычно классифицируется как имеющее позднее начало, которое возникает в пожилом возрасте (65+ лет), и раннее начало, которое развивается задолго до старческого периода, т.е. в период от 35 до 60 лет. Патология заболевания, по-видимому, одинакова для обоих типов заболевания, но аномалии имеют тенденцию быть более тяжелыми и широко распространенными в случаях, начинающихся в более раннем возрасте. Заболевание характеризуется как минимум двумя типами поражений головного мозга: нейрофибриллярными клубками и сенильными бляшками. Нейрофибриллярные клубки представляют собой внутриклеточные отложения тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, состоящие из двух филаментов, попарно скрученных друг с другом. Сенильные бляшки (т.е. амилоидные бляшки) представляют собой участки дезорганизованного нейропила до 150 мкм в поперечнике с внеклеточными отложениями амилоида в центре, которые видны при микроскопическом анализе срезов ткани головного мозга. Накопление амилоидных бляшек в головном мозге также связано с синдромом Дауна и другими когнитивными расстройствами.

[005] Основным компонентом бляшек является пептид, называемый Аβ (Абета) или β-амилоидным пептидом. Пептид Аβ представляет собой внутренний фрагмент размером 4 кДа из 39-43 аминокислот более крупного трансмембранного гликопротеина, называемого белком-предшественником амилоида (APP). В результате протеолитического

процессинга APP различными ферментами из семейства секретаз A β преимущественно обнаруживается как в короткой форме, 40 аминокислот в длину, так и в длинной форме, от 42-43 аминокислот в длину. Часть гидрофобного трансмембранного домена APP обнаружена на карбокси-конце A β , и этим может объясняться способность A β агрегировать в бляшки, особенно в случае длинной формы. Накопление амилоидных бляшек в головном мозге в конечном итоге приводит к гибели нейрональных клеток. Физические симптомы, связанные с этим типом повреждения нейронов, характеризуют болезнь Альцгеймера.

Сущность изобретения

[006] Настоящее изобретение относится к антителам (и фрагментам антител), которые специфически связываются с A β , к способам получения таких антител и фрагментов антител и к связанным с этим нуклеиновым кислотам, к способам лечения пациентов с A β -связанными неврологическими расстройствами, к фармацевтическим композициям и композициям антител, которые демонстрируют высокую аффинность связывания с A β , для профилактического и/или терапевтического применения, например, для лечения, снижения риска или отсрочки начала амилоидогенетического заболевания, предотвращения, уменьшения или ингибирования маркеров амилоидогенетического заболевания, например A β бляшек, и улучшения когнитивных функций. Настоящее изобретение также относится к способам обнаружения амилоидных бляшек и определения эффективности лечения у пациентов, проходящих лечение от амилоидогенетического заболевания. Изобретение основано, по меньшей мере частично, на идентификации и характеристике моноклональных антител, которые специфически связываются с пептидом A β и эффективны для уменьшения количества бляшек и нейтрализации растворимых видов A β , связанных с амилоидогенетическими расстройствами.

[007] В различных аспектах изобретение направлено на антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с A β пептидом. Антитела и фрагменты включают переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи являются такими, как показано для одного из антител в Таблице 1. Кроме того, антитела или фрагменты по изобретению могут содержать переменную область тяжелой цепи, которая является такой, как показано для одного из антител в Таблице 1, и могут содержать переменную область легкой цепи, которая показана для одного из антител в Таблице 1.

[008] В различных вариантах осуществления изобретения антитела и их фрагменты включают переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где

CDR1 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 16, 19 или 20,

CDR2 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23,

CDR3 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 18, 24 или 25,
 CDR1 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 26, 29, 31 или 32,
 CDR2 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36 и
 CDR3 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 28, 38 или 39.

[009] Антитело или его фрагмент по изобретению может включать переменную область тяжелой цепи, которая, за исключением CDR-областей, по меньшей мере на 95% или 98% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 и 7, и переменную область легкой цепи, которая, за исключением CDR-областей, по меньшей мере на 95% или 98% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Кроме того, переменная область тяжелой цепи может быть выбрана из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 и 7, а переменная область легкой цепи может быть выбрана из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

[0010] В других вариантах осуществления изобретение направлено на антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с A β пептидом, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые имеют следующие аминокислотные последовательности:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность GFTFSNX₁GMS, где X₁ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 88);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGSGRITYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V (SEQ ID NO: 89);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDNHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T, а X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность KSSQSLLDYDGKTYLN (SEQ ID NO: 91);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRDX₃, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой S или T и X₃ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 92).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGTNHFPRX₁, где X₁ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 93).

[0011] Кроме того, CDR3 легкой цепи может представлять собой WQGTNHFPRX₁FX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 94).

[0012] Кроме того, варианты осуществления изобретения направлены на антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с A β пептидом, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, которые имеют следующие аминокислотные последовательности:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность

GFTFX₁NX₂GMS, где X₁ представляет собой S или A и X₂ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 95);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGX₂X₃RTYYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V, X₂ представляет собой S или G и X₃ представляет собой S или G (SEQ ID NO: 96);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁SSQSLX₂DX₃DGKTYLN, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой V, M или L и X₃ представляет собой Y, T или S (SEQ ID NO: 97);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRX₃X₄, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой S или T, и X₃ представляет собой E или D и X₄ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 98).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGX₁HFPRX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 99).

[0013] CDR3 легкой цепи также может включать WQGT₁HFPRX₁FX₂X₃, где X₁ представляет собой S или T, X₂ представляет собой S или T и X₃ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 100).

[0014] В других аспектах изобретения антитело или его фрагмент является гуманизированным, представляет собой человеческий IgG1 или может представлять собой полное антитело, химерное антитело, CDR-привитое антитело или рекомбинантное антитело. Фрагменты антител могут включать Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc или Fv.

[0015] Более того, антитело или фрагмент по изобретению может включать константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:40, и может включать константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:41. Антитело или фрагмент может специфически связываться с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, содержащую три или более аминокислотных положений из аминокислот 1-7 Aβ.

[0016] В дополнительных аспектах изобретение направлено на нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела, описанного в настоящей заявке.

[0017] Изобретение также направлено на фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке.

[0018] В различных вариантах осуществления изобретение направлено на способ получения антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке. Способ может включать (а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела или его фрагмента, таким образом, клетки

секретируют антитело или его фрагмент; и (b) очистку антитела или его фрагмента из клеточной культуры.

[0019] В другом аспекте изобретение направлено на способ получения клеточной линии, продуцирующей антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке. Способ может включать (a) введение в клетки вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела или его фрагмента, и селективируемого маркера; (b) размножение клеток в условиях для отбора клеток, имеющих повышенное число копий вектора; (c) выделение отдельных клеток из отобранных клеток; и (d) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основании выхода антитела или его фрагмента. Способ также может включать размножение клеток в селективных условиях и скрининг для идентификации клеточных линий, естественным образом экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

[0020] Дополнительные аспекты включают способы профилактики или лечения амилоидогенетического заболевания у пациента. Способы включают введение пациенту эффективной дозы антитела или фрагмента, описанных в настоящей заявке. Амилоидогенетическое заболевание может представлять собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

[0021] При амилоидогенетическом заболевании способы по изобретению могут включать введение пациенту, имеющему такое заболевание, антитела или его фрагмента по схеме, эффективной для лечения заболевания. Кроме того, способы по изобретению включают снижение риска или задержку начала болезни Альцгеймера у пациента, у которого риск заболевания был определен на основании генетического или биохимического маркера. Способ включает введение пациенту, имеющему такое заболевание, антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке, по схеме, эффективной для снижения риска или задержки начала болезни.

[0022] Кроме того, изобретение направлено на способ улучшения когнитивных способностей у субъекта, имеющего связанное с амилоидогенетическим заболеванием состояние или заболевание. Способы включают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке. Амилоидогенетическое заболевание может представлять собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

[0023] Более того, изобретение направлено на способ лечения синдром Дауна или клинической или доклинической болезни Альцгеймера у субъекта-человека. Способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке.

[0024] Способ по изобретению также включают одно или более из следующего: ингибирование образования амилоидных бляшек у субъекта-человека, уменьшение амилоидных бляшек в головном мозге у субъекта-человека, ингибирование или

уменьшение амилоидных бляшек у субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития. Способы включают введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке. В каждом из этих способов амилоидная бляшка может включать $A\beta_{1-42}$, пироглутаматный тип $A\beta$ (например, $A\beta_{\text{pE3-42}}$) или их комбинацию.

[0025] Еще в одном аспекте изобретение направлено на способ выявления амилоидных бляшек у субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития. Способ включает введение субъекту антитела или фрагмента, описанного в настоящей заявке, и детекцию антитела или его фрагмента, связанного с $A\beta$, у субъекта. Амилоидогенетическое заболевание представляет собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения. В способах детекции антитело или его фрагмент могут быть помечены, например флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой. Радиоактивную метку можно определить с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

[0026] Способ определения эффективности лечения у субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания, содержащий:

(a) измерение первого уровня амилоидных бляшек у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 и определения первого количества антитела или его фрагмента, связанного с $A\beta$, у субъекта,

(b) введение лечения субъекту,

(c) измерение второго уровня амилоидных бляшек у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента, и детекцию антитела или его фрагмента, связанного с $A\beta$, у субъекта,

где снижение уровня амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение.

[0027] Более того, другие аспекты изобретения включают способ определения эффективности лечения у субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания. Способы включают (a) измерение первого уровня амилоидных бляшек у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке, и определения первого количества антитела или его фрагмента, связанного с $A\beta$, у субъекта, (b) введение лечения субъекту, (c) измерение второго уровня амилоидных бляшек у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента и определения второго количества антитела или его фрагмента, связанного с $A\beta$, у субъекта. Отсутствие изменения уровня амилоидных бляшек или небольшое повышение уровня амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение.

[0028] Способы по изобретению также включают уменьшение, устранение или стимулирование клиренса $A\beta$ или уменьшение или ингибирование аккумуляции или

агрегации А β у субъекта-человека. Такие способы включают введение субъекту антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке, с использованием эффективной схемы введения. А β может присутствовать в ткани головного мозга субъекта.

[0029] Способы по настоящему изобретению также включают уменьшение, стимулирование клиренса или устранение А β в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития. Такие способы включают введение субъекту антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке, с использованием эффективной схемы введения.

[0030] Способы по настоящему изобретению также включают ингибирование или уменьшение аккумуляции или агрегации А β в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития. Такие способы включают введение субъекту антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке, с использованием эффективной схемы введения.

[0031] Способ ингибирования аккумуляции или агрегации А β в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-18 с использованием эффективной схемы введения, ингибируя таким образом аккумуляцию или агрегацию А β в ткани головного мозга у субъекта. Амилоидогенетическое заболевание может представлять собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения. А β может представлять собой А β ₁₋₄₂, пироглутаматный тип А β (например, А β _{РЕ3-42}) или их комбинацию.

[0032] В каждом из описанных выше способов по изобретению антитело вводят путем периферического введения, которое может представлять собой внутривенное или подкожное введение.

Краткое описание чертежей

[0033] Фиг. 1 представляет выравнивание трех разных вариантов VL, которые были сконструированы путем встраивания остатков каркасной области зародышевого типа человека в последовательность VL бапинеиумаба (hBP). Канонические или граничные остатки не были изменены.

[0034] Фиг. 2 представляет графики конкурентного анализа ELISA для 4918, 4917, 4921, 3818, 49human3, 2931 и бапинеиумаба в качестве контроля для определения отношений значений IC₅₀ относительно бапинеиумаба (hBP).

[0035] Фиг. 3 представляет графики конкурентного анализа ELISA для 2926, 2831, 2927, 2726, 2731, 2826 и бапинеиумаба в качестве контроля для определения отношений значений IC₅₀ относительно бапинеиумаба (hBP).

[0036] Фиг. 4 представляет графики конкурентного анализа ELISA для 2727, 2931 и бапинеиумаба в качестве контроля для определения отношений значений IC₅₀ относительно бапинеиумаба (hBP).

[0037] Фиг. 5А и Фиг. 5В представляют графики конкурентного анализа ELISA для

h2931, h2731 и бапинейзумаба (Фиг. 5А) и h2726, h2831 и бапинейзумаба (Фиг. 5В).

[0038] Фиг. 6 представляет сенсограммы ВІАcore связывания h2726 (Фиг. 6А), h2731 (Фиг. 6В), h2831 (Фиг. 6С) и h2931 (Фиг. 6D) с Аβ₁₋₂₈ при концентрациях аналита от 100нМ до 0,39 нМ (2-кратные серийные разведения).

[0039] Фиг. 7 представляет ВІАcore сенсограмму, сравнивающую характеристики связывания гуманизированных антител (РВ-0569 (адуканумаб), РВ-0573 (h2726), РВ-0574 (h2731), РВ-0575 (h2831), РВ-0576 (h2931)) с фибриллами рекомбинантного Аβета 1-42 (Аβ₁₋₄₂).

[0040] Фиг. 8 показывает, что h2931 связывается с растворимыми олигомерами Аβ с высокой относительной аффинностью.

[0041] Фиг. 9 представляет графики оценки связывающей активности h2726, h2731, h2831, h2931 в отношении Аβ фибрилл по сравнению с контролем адуканумабом. Антитело титровали в постоянной концентрации Аβ фибрилл (левый график) или Аβ фибриллы титровали в постоянной концентрации антитела (правый график), оба графика показывают значительно лучшее связывание для h2726, h2731, h2831 и h2931, чем для адуканумаба.

[0042] Фиг. 10 представляет связывание Аβ в головном мозге при AD. Связывание с Аβ-патологией ткани оказывается схожим для h2726, h2731, h2831 и h2931 антител. Примеры изображений, окрашенных четырьмя антителами, h2726, h2731, h2831, h2931, при 0,3 мкг/мл представляют их паттерн окрашивания в головном мозге двух субъектов с AD с разными количествами Аβ-патологии (AD 11-97 и AD 13-75). Для каждого головного мозга изображения получены из одной и той же области среза и показывают сравнительно одинаковую интенсивность и распределение патологии со всеми четырьмя антителами. Окрашивание адуканумабом всегда было самым слабым (масштабная метка: 500 мкм).

[0043] Фиг. 11 представляет связывание Аβ в головном мозге при AD для контролей. Человеческое IgG изотипическое контрольное антитело не давало никакого окрашивания в головном мозге субъектов с AD. Как показано в этих примерах, AD срезы, которые инкубировали с изотипом IgG человека при 1 мкг/мл, не имели никакого окрашивания (масштабная метка: 500 мкм).

[0044] Фиг. 12 представляет количественную оценку связывания Аβ в головном мозге при AD. Количественная оценка окрашивания Аβ-патологии в AD тканях выявила аналогичное связывание для h2726, h2731, h2831 и h2931 антител. Срез головного мозга от четырех субъектов с AD инкубировали с антителами h2726, h2731, h2831, h2931, а также с адуканумабом в следующих концентрациях: 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 и 9 мкг/мл. После визуализации срезов процент площади окрашенной ткани определяли морфометрически с использованием программного обеспечения для анализа изображений Halo®. На каждом графике сравниваются результаты измерений в головном мозге субъектов с AD, полученные с пятью антителами. Четыре графика последовательно показывают, что профили связывания антител h2726, h2731, h2831, h2931 аналогичны. Показатели,

полученные с адуканумабом, были значительно ниже.

[0045] **Фиг. 13** показывает связывание Аβ в головном мозге при AD. hBP связывается с Аβ-патологией ткани сильно и дозозависимым образом. Изображения из относительно той же области среза (головной мозг с AD 13-75) с аналогичным распределением патологии. hBP показывает увеличение количества окрашивания с концентрацией, и его связывание с Аβ-патологией было сильнее, чем у BAN2401 или адуканумаба при каждой концентрации (масштабная метка: 500 мкм).

[0046] **Фиг. 14** представляет индивидуальные (**Фиг. 14A**) и сводные (**Фиг. 14B**) результаты исследования фагоцитоза *ex vivo* для h2931 и адуканумаба в ткани мышей APP.PS1 Tg с первичной мышинной микроглией. h2931 и адуканумаб демонстрируют весьма значительное снижение Аβ₁₋₄₂ по сравнению с изотипическим контролем. **Фиг. 14B**

[0047] **Фиг. 15** представляет графики, показывающие снижение связывания растворимого олигомера с нейритами на нейронах гиппокампа крысы при повышении концентрации h2726, h2731, h2831 и h2931 по сравнению с изотипическим контролем и нормализацию при добавлении +/- Аβ. **Фиг. 15A** показывает количество пятен на нейрон, а **Фиг. 15B** показывает общее количество пятен (при 40 полях на лунку).

[0048] **Фиг. 16** представляет график, показывающий выраженное в процентах количество Аβ пятен на нейрон с увеличением концентрации 2726, 2731, 2831 и 2931, нормализованное добавлением +/- Аβ.

[0049] **Фиг. 17** представляет выравнивание последовательности вариабельной области тяжелой цепи бапинеизумаба и четырех последовательностей по изобретению 2726, 2731, 2831 и 2931. CDR выделены жирным шрифтом.

[0050] **Фиг. 18** представляет выравнивание последовательности легкой цепи бапинеизумаба и четырех последовательностей (вариабельной области легкой цепи) по изобретению 2726, 2731, 2831 и 2931. CDR выделены жирным шрифтом.

[0051] **Фиг. 19** представляет таблицу CDR, показывающую последовательности CDR вариабельных областей тяжелой и легкой цепи для антител по изобретению. **Фиг. 19A** относится к CDR тяжелой цепи, а **Фиг. 19B** относится к CDR легкой цепи.

[0052] **Фиг. 20** представляет графики измерения активности антитела в отношении связывания гетерогенных агрегированных видов Аβ₄₂ с использованием конкурентного ELISA. **Фиг. 20A** представляет h2931, h2731 и контроль бапинеизумаб, а **Фиг. 20BA** представляет h2831, h2726 и контроль бапинеизумаб.

[0053] **Фиг. 21** представляет графики измерения прямого связывания и относительной аффинности антител в отношении фибриллярного Аβ₄₂ методом ELISA.

[0054] **Фиг. 22** представляет графики измерения дозозависимого связывания антител с областью Аβ бляшек, измеренное как процент положительной ткани, определенный методом иммуногистохимического окрашивания, в головном мозге при AD.

[0055] **Фиг. 23** представляет количественную оценку связывания растворимого Аβ с нейронами гиппокампа крысы в присутствии антитела.

[0056] Фиг. 24 представляет результаты *ex vivo* исследования фагоцитоза h2731 в AD ткани с первичной мышиной микроглией. h2731 продемонстрировал очень значительное снижение $A\beta_{1-42}$, что указывает на то, что антитело сильно стимулировало фагоцитоз и удаление этих видов.

[0057] Фиг. 25A и 25B подтверждают присутствие пироглутамат-3 $A\beta$ ($A\beta_{pE3-42}$) в AD ткани, используемой для анализов фагоцитоза *ex vivo* (Фиг. 23A), и демонстрируют аналогичный паттерн связывания для пироглутамат-3 $A\beta$ и h2931 (Фиг. 23A и B).

[0058] Фиг. 26A и 26B представляют результаты *ex vivo* исследования фагоцитоза h2931 и h2731 в AD ткани с первичной мышиной микроглией. h2931 и h2731 оба продемонстрировали очень значительное снижение пироглутамат-3 $A\beta$ ($A\beta_{pE3-42}$), указывающее на то, что оба антитела сильно стимулировали фагоцитоз и удаление этих видов.

[0059] Фиг. 27 показывает, что h2731 связывается с N-концом $A\beta_{1-42}$, но не $A\beta_{pE3-42}$.

[0060] Фиг. 28A и 28B показывают, что антитела по настоящему изобретению индуцируют фагоцитоз $A\beta_{1-42}$ протофибрилл в моноцитах ТНР-1 человека *in vitro*.

[0061] Фиг. 29A и Фиг. 29B представляют картину распределения $A\beta_{1-XX}$, определенную при помощи антитела, нацеленного на N-конец $A\beta$, по сравнению с $A\beta_{pE3-42}$ в ткани головного мозга человека с AD. Фиг. 29C представляет количественную оценку процента площади, покрытой $A\beta_{1-XX}$, по сравнению с $A\beta_{pE3-42}$ в ткани головного мозга человека с AD.

[0062] Фиг. 30 представляет локализацию h2731 в $A\beta$ бляшках, локализацию сигнала анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитела в $A\beta$ бляшках и совместную локализацию h2731 и сигнала анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитела в $A\beta$ бляшках.

[0063] Фиг. 31A и Фиг. 31B показывают, что анти- $A\beta$ -антитело h2731 способствует клиренсу $A\beta_{pE3-42}$ из ткани головного мозга при AD *ex vivo* дозозависимым образом с более высокой активностью, чем адуканумаб.

[0064] Фиг. 32A представляет зависимый от концентрации h2731 и адуканумаба клиренс $A\beta_{pE3-42}$ из ткани головного мозга, а Фиг. 32B показывает, что эффект h2731 зависит от микроглии.

[0065] Фиг. 33 сравнивает прогнозируемую концентрацию h2731 и адуканумаба в ЦНС при многократном введении.

[0066] Фиг. 34 показывает, что анти- $A\beta$ антитело h2731 способствует клиренсу бляшек, содержащих $A\beta_{pE3-42}$, в ткани головного мозга при AD *ex vivo*.

Подробное описание изобретения

[0067] Клинически было продемонстрировано, что моноклональные антитела (mAb), направленные на N-конец бета-амилоида ($A\beta$), уменьшают количество амилоидных бляшек, и одно из таких антител, адуканумаб, показало, что значительное снижение количества бляшек было связано с замедлением снижения когнитивных функций при болезни Альцгеймера (AD). Доклинические исследования также показали, что моноклональные антитела (mAb), нацеленные на N-концевые эпитопы $A\beta$, вызывают

антитело-зависимый микроглия-опосредованный клиренс А β -бляшек и нейтрализацию растворимых токсичных олигомеров А β как *in vitro*, так и *in vivo*. Предполагается, что введение моноклональных антител, нацеленных на N-конец А β , замедляет прогрессирование заболевания за счет клиренса А β бляшек и нейтрализации растворимых А β агрегатов у пациентов с AD.

[0068] Антитело к А β бапинеизумаб (hBP) представляет собой гуманизованное антитело, полученное из родительского мышиного антитела 3D6. В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения для конструирования антител, превосходящих hBP, применяли комплексный подход. Была проанализирована гуманизация hBP, и было установлено, что гуманизация легкой цепи может быть оптимизирована.

[0069] Был проведен поиск белковых последовательностей в базе данных PDB [Deshpande et al, 2005], чтобы найти структуры, которые могли бы обеспечить грубую структурную модель hBP. Кристаллическую структуру hBP fab PDB, код 4NIX [Miles, et al., 2013], использовали для обеих структур Vh и Vk, поскольку она имела приемлемое разрешение и точное соответствие последовательности с hBP Vh и Vk, сохраняя те же канонические структуры для петель.

[0070] IMGT/DomainGapAlignment применяли для VL hBP в качестве входных последовательностей для идентификации последовательности гена VK зародышевой линии человека IGHV2-30*02 как наиболее близкой к VL hBP. Каркасы VL hBP обладают высокой степенью сходства последовательностей с соответствующими каркасными областями IGHV2-30*02. Таким образом, каркасные области IGHV2-30*02 VL были выбраны в качестве направляющей последовательности для дальнейшей оптимизации каркасных областей hBP. Дополнительные остатки в CDR-L2, которые не вступают в прямой контакт с антигеном в соответствии с трехмерной структурой hBP, также были заменены последовательностью зародышевой линии, что привело к следующим изменениям.

[0071] Три различные варианта VL были сконструированы путем включения каркасных остатков зародышевой линии человека в последовательность VL hBP. Канонические или граничные остатки не были изменены. Кроме того, на основании наблюдения за структурой, согласно которому P15 расположен на изгибе, а ген зародышевой линии имеет Leu в этом положении, P15L был протестирован в одном варианте варибельной области легкой цепи.

[0072] На основании наблюдений трехмерной структуры были сконструированы замены ряда остатков в CDR легкой и тяжелой цепей и каркасе. Мутантные варианты VL и VH были созданы и протестированы на связывание в первом раунде рационального дизайна. Мутации, показавшие улучшенное связывание, объединяли во втором раунде рационального дизайна. Кроме того, в дизайн также были включены новые мутации на основании дальнейшего анализа структуры.

[0073] Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает антитела (и

фрагменты антител), кодирующие их нуклеиновые кислоты и способы получения таких антител и фрагментов антител, фармацевтические композиции и способы профилактики или лечения амилоидогенетического заболевания, снижения риска или задержки начала амилоидогенетического заболевания, улучшения когнитивных функций у субъекта, имеющего состояние, связанное с амилоидогенетическим заболеванием, ингибирования образования Аβ бляшек у субъекта, уменьшения Аβ бляшек в головном мозге субъекта, ингибирования или уменьшения амилоидных бляшек у субъекта, имеющего риск развития амилоидогенетического заболевания, обнаружения амилоидных бляшек, определения эффективности лечения субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания, где амилоидогенетическое заболевание включает болезнь Альцгеймера и др., как описано в настоящей заявке. Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на исследовании характеристик рода моноклональных антител, эффективных для связывания бета-амилоидного белка (Аβ) (например, связывания растворимого и/или агрегированного Аβ), опосредования фагоцитоза (например, агрегированного Аβ), уменьшения количества бляшек и/или уменьшения нейритной дистрофии (например, у пациента), нейтрализации растворимых токсичных видов Аβ. Антитела и фрагменты по настоящему изобретению демонстрируют большую силу связывания (аффинность и/или авидность) в отношении патологического фибриллярного Аβ, чем известные современные экспериментальные терапии, и высокую аффинность в отношении растворимых токсичных форм Аβ. Эти антитела могут обеспечить более удобные стратегии дозирования и расширенный доступ для пациентов.

[0074] Перед более подробным описанием конкретных аспектов изобретения представлено определение ряда терминов.

[0075] Определения

[0076] Термин «антитело» включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с мишенью. Фрагменты включают отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Fv и однодоменные антитела. Однодоменные (с одним переменным доменом) антитела, включают VH области, отделенные от их VL партнеров (или наоборот) в обычных антителах (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546), а также VH области (иногда известные как VHH) от таких видов, как верблюдовые или хрящевые рыбы (например, акула-нянька), у которых VH области не связаны с VL областями (см., например, WO 9404678). Однодоменные антитела, в которых одна цепь отделена от своих естественных партнеров, иногда называют Dabs, а однодоменные антитела от верблюдовых или хрящевых рыб иногда называют нанотелами. Константные области или части константных областей могут присутствовать или отсутствовать в однодоменных антителах. Например, природные антитела с одной переменной областью от верблюдовых включают переменную область VHH и константные области CH2 и CH3. Однодоменные антитела могут быть гуманизированы с использованием таких же подходов, как к обычным антителам.

Антитела типа Dabs обычно получают из антител человеческого происхождения. Антитела типа НАНОТЕЛА имеют происхождение от верблюдовых или акул и могут быть гуманизированы. Фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим разделением интактных иммуноглобулинов. Термин «антитело» также включает биспецифическое антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелая/легкая цепь и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al. *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)).

[0077] Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также иногда указана в настоящей заявке как «вариабельный домен легкой цепи» («VL домен») или «вариабельный домен тяжелой цепи» («VH домен»), соответственно) состоит из «каркасной» области, прерываемой тремя «определяющими комплементарность областями» или «CDR». Каркасные области служат для выравнивания CDR для специфического связывания с эпитопом антигена. CDR включают аминокислотные остатки антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От amino-конца до карбокси-конца оба домена VL и VH включают следующие каркасные области (FR) и CDR области: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также иногда указываются соответственно как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также иногда указываются соответственно как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Когда заявка раскрывает последовательность VL с R в качестве C-концевого остатка, R можно альтернативно рассматривать как N-концевой остаток константной области легкой цепи. Таким образом, заявка также должна пониматься как раскрывающая последовательность VL без C-концевого R.

[0078] Назначение аминокислот каждому домену VL и VH соответствует любому общепринятому определению CDR. Традиционные определения включают определение по Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)), определение по Chothia (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989); комбинацию CDR согласно Chothia и Kabat, в которой CDR-H1 представляет собой комбинированные CDR согласно Chothia и Kabat; определение AbM, используемое программой моделирования антител Oxford Molecular; и определение контактов по Martin et al. (bioinfo.org.uk/abs) (см. Таблицу А). Kabat предлагает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация по Kabat), в котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначаются одинаковые номера. Когда говорят, что антитело содержит CDR согласно определенному определению CDR (например, по Kabat), это определение указывает минимальное количество CDR остатков, присутствующих в антителе (т.е. CDR по Kabat). Это не исключает, что другие остатки, подпадающие под другое условное определение CDR, также присутствуют, но вне указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные по Kabat,

включает, среди прочего, антитело, в котором CDR содержат CDR остатки по Kabat и не содержат других CDR остатков, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой комбинированную CDR H1 по Chothia-Kabat, а другие CDR содержат CDR остатки по Kabat и не содержат никаких дополнительных CDR остатков на основе других определений.

Таблица А

Условные определения CDR с использованием нумерации по Kabat

Петля	Kabat	Chothia	Комбинация Chothia & Kabat	AbM	Контакт
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

* CDR-H1 по Chothia может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что схема нумерации Kabat помещает вставки дополнительных остатков в 35A и 35B, тогда как нумерация Chothia помещает их в 31A и 31B. Если не присутствует ни H35A, ни H35B (нумерация по Kabat), петля CDR-H1 по Chothia заканчивается на H32. Если присутствует только H35A, она заканчивается на H33. Если присутствуют оба H35A и H35B, она заканчивается на H34

[0079] В некоторых вариантах осуществления CDR гуманизированных антител по настоящему изобретению имеют определение, выбранное из группы Kabat, Chothia, комбинации Kabat/Chothia, AbM и Контакт.

[0080] Одна или несколько аминокислот на амино- или карбокси-конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированы в части или во всех молекулах. Замены могут быть осуществлены в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или продления периода полужизни в организме человека (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Примеры замен включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (в этом подразделе используется EU нумерация для константной области) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом или во всех положениях 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность в отношении Fcγ рецепторов, в частности FcγRI рецептора (см., например, US 6624821). Замену аланином в положениях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 можно использовать

для уменьшения эффекторных функций. Некоторые антитела имеют замену аланином в положениях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 для уменьшения эффекторных функций. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в человеческом IgG2 заменены аланином, а положение 235 глутамином (см., например, US 5624821). В некоторых антителах используют мутацию в одном или нескольких положениях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331, в соответствии с EU нумерацией, человеческого IgG1. В некоторых антителах используют мутацию в одном или нескольких положениях 318, 320 и 322, в соответствии с EU нумерацией, человеческого IgG1. В некоторых антителах положения 234 и/или 235 заменены аланином и/или положение 329 заменено глицином. В некоторых антителах положения 234 и 235 заменены аланином. В некоторых антителах изотипом является человеческий IgG2 или IgG4.

[0081] Термин «гуманизированный иммуноглобулин» или «гуманизированное антитело» относится к иммуноглобулину или антителу, которые включают по меньшей мере одну гуманизованную цепь иммуноглобулина или антитела (т.е. по меньшей мере одну гуманизованную легкую или тяжелую цепь). Термин "гуманизованная цепь иммуноглобулина" или "гуманизованная цепь антитела" (т.е. "гуманизованная легкая цепь иммуноглобулина" или "гуманизованная тяжелая цепь иммуноглобулина") относится к цепи иммуноглобулина или антитела (т.е. легкой или тяжелой цепи, соответственно), имеющей переменную область, которая включает каркасный участок переменной области по существу из человеческого иммуноглобулина или антитела и определяющие комплементарность области (CDR) (например, по меньшей мере одну CDR, предпочтительно две CDR, более предпочтительно три CDR) по существу из иммуноглобулина или антитела нечеловеческого происхождения, а также включает константные области (например, по меньшей мере одну константную область или ее часть в случае легкой цепи и предпочтительно три константные области в случае тяжелой цепи). Термин «гуманизованная переменная область» (например, «гуманизованная переменная область легкой цепи» или «гуманизованная переменная область тяжелой цепи») относится к переменной области, которая включает каркасный участок переменной области по существу из человеческого иммуноглобулина или антитела и определяющие комплементарность области (CDR) по существу из иммуноглобулина или антитела нечеловеческого происхождения.

[0082] Соответственно, области или остатки гуманизованного иммуноглобулина или антитела, или гуманизованной цепи иммуноглобулина или антитела, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим областям или остаткам одной или нескольких последовательностей природного иммуноглобулина человека. Термин "соответствующая область" или "соответствующий остаток" относится к области или остатку второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, который занимает то же (т.е. эквивалентное) положение, что и область или остаток первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, когда первая и вторая последовательности оптимально выровнены для целей сравнения.

[0083] Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, совмещенных друг с другом при третичной укладке одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Когда говорят, что эпитоп находится в пределах диапазона аминокислотных остатков в белке (например, в пределах остатков с 1 по 6 Аβ), этот диапазон включает остатки, определяющие его границы. Определенные остатки в пределах диапазона вносят вклад в эпитоп, тогда как другие могут не вносить вклад. Остатки, которые образуют эпитоп, могут быть или не быть смежными друг с другом. Аналогичным образом, когда антитело связывается с эпитопом, находящимся в определенном диапазоне аминокислот, антитело не обязательно должно контактировать со всеми остатками аминокислот в этом диапазоне, и остатки эпитопа, с которыми контактирует антитело, могут быть или не быть смежными друг с другом. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерно-магнитный резонанс. См., например, протоколы картирования эпитопов в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0084] Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп, могут быть идентифицированы при помощи простого иммуноанализа, показывающего способность одного антитела блокировать или конкурировать с другим антителом за связывание с антигеном-мишенью, т.е. анализа конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как Аβ. Известны различные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), сэндвичевый конкурентный анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press (1988)); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой

поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше.

[0085] Конкуренцию между антителами определяют при помощи анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела (например, 3D6, адуканумаба, бапинеизумаба) с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере 2×, 5×, 10×, 20× или 100×) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно проксимальным к эпитопу, связываемому эталонным антителом, для возникновения стерических затруднений.

[0086] Эпитоп антитела также можно определить при помощи рентгеноструктурного анализа антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[0087] Эпитоп также распознается клетками иммунной системы, например, В-клетками и/или Т-клетками. Клеточное распознавание эпитопа можно определить с использованием анализов *in vitro*, которые измеряют антиген-зависимую пролиферацию, определяемую по включению ³H-тимидина, секреции цитокинов, секреции антител или антиген-зависимому киллингу (анализ цитотоксических Т-лимфоцитов).

[0088] Типичные эпитопы или антигенные детерминанты могут быть обнаружены в белке-предшественнике амилоида человека (APP), но предпочтительно находятся в Aβ пептиде APP. Существует несколько изоформ APP, например APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ и APP⁷⁷⁰. Аминокислотам в APP присвоены номера в соответствии с последовательностью изоформы APP⁷⁷⁰ (см., например, номер доступа GenBank P05067, также представлена как SEQ ID NO:85).

[0089] Aβ (также называемый в настоящей заявке бета-амилоидным пептидом и А-бета) пептид представляет собой внутренний фрагмент размером около 4 кДа, состоящий из 39-43 аминокислот APP (Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 и Aβ43). Aβ40, например, состоит из остатков 672-711 APP, а Aβ42 состоит из остатков 673-713 APP. В результате

протеолитического процессинга APP различными ферментами секретазами *in vivo* или *in situ* A β обнаруживается как в «короткой форме», 40 аминокислот в длину, так и в «длинной форме», от 42-43 аминокислот в длину. Предпочтительные эпитопы или антигенные детерминанты, как описано в настоящей заявке, расположены в пределах N-конца пептида A β и включают остатки в пределах аминокислот 1-10 A β , предпочтительно из остатков 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 или 3-7 A β 42. Дополнительные эпитопы или антигенные детерминанты, которые могут быть указаны, включают остатки 2-4, 5, 6, 7 или 8 A β , остатки 3-5, 6, 7, 8 или 9 A β или остатки 4-7, 8, 9 или 10 A β 42.

[0090] «Растворимый» или «диссоциированный» A β относится к разновидностям A β , которые являются мономерными, агрегированными, олигомерными, связанными или не связанными с другими белками и липидами, которые остаются в растворе (супернатанте) после центрифугирования при $100000 \times g$. «Нерастворимый» A β относится к агрегированным разновидностям A β , амилоидным (бета-лист) или нет, которые не остаются в растворе после центрифугирования при $100000 \times g$, например, A β удерживаются вместе нековалентными связями. Считается, что A β (например, A β 42) агрегирует, по меньшей мере частично, из-за присутствия гидрофобных остатков на C-конце пептида (часть трансмембранного домена APP). Одним из способов получения растворимого A β является растворение лиофилизированного пептида в чистом DMSO с обработкой ультразвуком. Полученный раствор центрифугируют для удаления любых нерастворимых частиц.

[0091] «Специфическое связывание» антитела означает, что антитело проявляет существенную аффинность к антигену или предпочтительному эпитопу и, предпочтительно, не проявляет значительной перекрестной реактивности. «Существенное» или предпочтительное связывание включает связывание с аффинностью по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹ или 10^{10} M⁻¹. Аффинности более 10^7 M⁻¹, предпочтительно более 10^8 M⁻¹, являются более предпочтительными. Промежуточные значения в пределах указанных выше значений также подразумеваются как находящиеся в рамках настоящего изобретения, и предпочтительная аффинность связывания может быть указана в виде диапазона аффинностей, например, от 10^6 до 10^{10} M⁻¹, предпочтительно от 10^7 до 10^{10} M⁻¹, более предпочтительно от 10^8 до 10^{10} M⁻¹. Антитело, которое «не проявляет значительной перекрестной реактивности», представляет собой антитело, которое не будет заметно связываться с нежелательным соединением (например, нежелательным белковым соединением). Например, антитело, которое специфически связывается с A β , будет в значительной степени связываться с A β , но не будет в значительной степени реагировать с белками или пептидами, отличными от A β (например, белками или пептидами, не относящимися к A β , включенными в бляшки). Антитело, специфическое в отношении предпочтительного эпитопа, не будет, например, в значительной степени перекрестно реагировать с удаленными эпитопами на том же белке или пептиде. Специфическое связывание можно определить любым известным в данной области способом определения такого связывания. Предпочтительно специфическое

связывание определяют с использованием анализа Скэтчарда и/или анализов конкурентного связывания.

[0092] Связывающие фрагменты получают методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, F_v, отдельные цепи и одноцепочечные антитела.

[0093] Термин «пациент» включает людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0094] Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения, или по меньшей мере частичного достижения, желаемого эффекта. Термин «терапевтически эффективная доза» определяется как количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от заболевания. Количества, эффективные для этого применения, будут зависеть от тяжести инфекции и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

[0095] Термин «лечение», используемый в настоящей заявке, определяется как применение или введение терапевтического средства пациенту, или нанесение или введение терапевтического средства в выделенную ткань или клеточную линию пациента, у которого имеется заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию, с целью лечения, исцеления, частичного снятия симптомов, облегчения, изменения, устранения, индукции регрессии или влияния на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию.

[0096] Термин «амилоидогенетическое заболевание» включает любое заболевание, связанное с образованием или отложением нерастворимых амилоидных фибрилл или амилоидных бляшек (или вызванное этим). Типичные амилоидогенетические заболевания включают, но не ограничиваются этим, системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна, легкие когнитивные нарушения, прион-связанные трансмиссивные губчатые энцефалопатии (куру и болезнь Крейтцфельда-Якоба у людей и скрепи и BSE у овец и крупного рогатого скота, соответственно) и т.п. Различные амилоидогенетические заболевания определяются или характеризуются природой полипептидного компонента отложений фибрилл. Например, у субъектов или пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, β -амилоидный белок (например, белок дикого типа, вариант или усеченный β -амилоидный белок) является характерным полипептидным компонентом амилоидного отложения. Соответственно, болезнь Альцгеймера является примером «заболевания, характеризующегося отложениями A β » или «заболевания, связанного с отложениями A β », например, в головном мозге субъекта или пациента. Термины « β -амилоидный белок», « β -амилоидный пептид», « β -амилоид», «A β » и «A β пептид» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо.

[0097] Субъект имеет повышенный риск заболевания, если у субъекта имеется по

меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез, ситуационное воздействие), что делает субъектов с этим фактором риска более подверженными статистически значимым образом развитию заболевания, чем лица без этого фактора риска.

[0098] Термин «симптом» относится к субъективному признаку заболевания, такому как изменение походки, воспринимаемому пациентом. «Признак» относится к объективным признакам заболевания, наблюдаемым врачом.

[0099] Статистическая значимость означает $p < 0,05$.

[00100] **Анти-Аβ антитела**

[00101] Что касается различных аспектов изобретения, первый аспект изобретения касается антитела или его фрагмента, которые специфически связываются с пептидом Аβ. Антитело или фрагмент включает CDR области тяжелой цепи и CDR области легкой цепи одной из конструкций, обозначенных в настоящей заявке как h2726, h2731, h2831, h2931, h2926, h4921, h2828, h2929, h3818G, h2927, h49k3G, h4917G h2727 и h4918G. Конкретные моноклональные антитела по настоящему изобретению могут связываться с эпитопом в пределах остатков 1-6 Аβ (где первый N-концевой остаток природного Аβ обозначен как 1). Некоторые моноклональные антитела связываются с эпитопом в пределах аминокислот 1-6, некоторые с эпитопом в пределах 1-5, а некоторые с эпитопом в пределах 1-4. Некоторые антитела связываются с эпитопами в пределах аминокислот 1-3, 2-5, 3-5, 2-4, 2-5, 2-6, 3-5 или 3-6. Когда говорят, что антитело связывается с эпитопом в пределах определенных остатков, таких как, например, Аβ 1-6, имеется в виду, что антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим указанные остатки (т.е. Аβ 1-6 в данном примере); такое антитело не обязательно контактирует с каждым остатком в Аβ 1-6.

[00102] В другом аспекте антитело или фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, имеющую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, из конструкций, представленных в Таблице 1А.

Таблица 1А

Конструкция ID	Последовательности VH/VL		SEQ ID	Последовательности CDR		SEQ ID
h2726	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGF TFSNYGMSWVRQ APGKGLEWVASIR SGSGRTYYSDNVK GRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCVRYDHYSGS SDYWGQGTLVTVS S	3	1	GFTFS NYGMS	16
				2	SIRSG SGRTY YSDNV KG	20
				3	YDHYS GSSDY	18
	VL	DVVM TQSPLSLPV	8	1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29

		TPGEPASISCKSSQS LLDYDGKTYLNLW LQKPGQSPQRLIYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRTFGQGT KVEIK		2 3	KVSNR DS WQGTH FPRT	33 28
h2731	VH	EVQLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNYGMSWVRQ APGKGLEWVASIR SGSGRTYYSDNVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCVRYDHYSGS SDYWGQGT LTVS S	3	1	GFTFS NYGMS	16
				2	SIRSG SGRTY YSDNV KG	20
				3	YDHYS GSSDY	18
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQ SLLDYDGKTYLNLW LLQKPGQSPQRLIY RVTNRDTGVPDRF SGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC WQGTHFPRSFGQG TKVEIK	9	1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
				2	RVTNR DT	34
				3	WQGTH FPRS	38
h2831	VH	EVQLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYSGTS DYWGQGT LTVSS	4	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
				3	YDHYS GTSDY	24
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQ SLLDYDGKTYLNLW LLQKPGQSPQRLIY RVTNRDTGVPDRF SGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC WQGTHFPRSFGQG TKVEIK	9	1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
				2	RVTNR DT	34
				3	WQGTH FPRS	38
h2931	VH	EVQLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV	5	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
				3	YDHYT GTSDY	25

		YYCVRYDHYTGTS DYWGQGTLVTVSS				
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQ SLLDYDGKTYLNW LLQKPGQSPQRLIY RVTNRDTGVPDRF SGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC WQGTHFPRSFGQG TKVEIK	9	1 2 3	KSSQS LLDYD GKTYL N RVTNR DT WQGTH FPRS	29 34 38
h2926	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYTGTS DYWGQGTLVTVSS	5	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
				3	YDHYT GTSDY	25
	VL	DVVMTQSPLSLPV TPGEPASISCKSSQS LLDYDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRTFGQGT KVEIK	8	1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
				2	KVSNR DS	33
				3	WQGTH FPRT	28
h4921G	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GGGRTYYSDNVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYSGTS DYWGQGTLVTVSS	6	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG GGRTY YSDNV	22
				3	KG YDHYS GTSDY	24
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQ SLLDSDGKTYLNW LLQKPGQSPQRLIY RVTNRDTGVPDRF SGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC WQGTHFPRTFGQG TKVEIK	10	1	KSSQS LLDS D GKTYL N	26
				2	RVTNR DT	34
				3	WQGTH FPRT	28
h2826	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS	4	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
				3	YDHYS GTSDY	24

		GSGRTYYSDNVKG RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYSGTS DYWGQGTLVTVSS				
	VL	DVVMTQSPLSLPV TPGEPASISCKSSQS LLDYDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLLYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRTFGQGT KVEIK	8	1 2 3	KSSQS LLDYD GKTYL N KVSNR DS WQGTH FPRT	29 33 28
h2929	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYTGTS DYWGQGTLVTVSS	5	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
				3	YDHYT GTSDY	25
	VL	DVVMTQSPLSLPV TPGEPASISCRSSQS LVDYDGKTYLNW LLQRPQSPQRLLY KVSNRDSGVPDRF SGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYC WQGSHPFRSYGQG TKVEIK	11	1	RSSQS LVDYD GKTYL N	31
				2	KVSNR DS	33
				3	WQGSHPFRS	39
h3818G	VH	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFANYGMSWVRQ APGKGLEWVASVR SGGSRTYYSDNVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCVRYDHYSGS SDYWGQGTLVTVS S	7	1	GFTFA NYGMS	20
				2	SVRSG GSRTY YSDNV KG	23
				3	YDHYS GSSDY	18
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQS LMDTDGKTYLNW LLQKPGQSPQRLLY KVSNRESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRTFGQGT KVEIK	12	1	KSSQS LMDTD GKTYL N	32
				2	KVSNR ES	35
				3	WQGTH FPRT	28

h2927	VH	EVQLLES GG GLVQ PGGSLRLS CA ASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDN SK N T LY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDH Y TGTS DYWGQGT L VTVSS	5	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG SGR T Y YSDNV KG	21
				3	YDH Y T GTSDY	25
	VL	DVVMTQSP L SLPV TPGEPASISCKSSQS LLDYDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDF T LKISR VEAEDVGVYYCW QGTHF P RSFGQGT KVEIK	13	1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
				2	KVSNR DS	33
				3	WQGTH FPRS	38
h49k3G	VH	EVQLLES GG GLVQ PGGSLRLS CA ASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GGRTYYSDNVKG RFTISRDN SK N T LY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDH Y SGTS DYWGQGT L VTVSS	6	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG GGR T Y YSDNV	22
				3	KG YDH Y S GTSDY	24
	VL	DVVMTQSP L SLPV T L GEPASISCKSSQS LLDSDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDF T LKISR VEAEDVGVYYCW QGTHF P RTFGQGT KVEIK	14	1	KSSQS LLDSD GKTYL N	26
				2	KVSNR DS	33
				3	WQGTH FPRT	28
h4917G	VH	EVQLLES GG GLVQ PGGSLRLS CA ASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GGRTYYSDNVKG RFTISRDN SK N T LY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDH Y SGTS DYWGQGT L VTVSS	6	1	GFTFS NFGMS	19
				2	SVRSG GGR T Y YSDNV	22
				3	KG YDH Y S GTSDY	24
	VL	DVVMTQSP L SLPV T L GEPASISCKSSQS LLDSDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYK VTNRESGVPDRFSG SGSGTDF T LKISR EAEDVGVYYCWQ	15	1	KSSQS LLDSD GKTYL N	26
				2	KVTNR ES	36
				3	WQGTH FPRS	38

		GTHFPRSGQGTK VEIK				
h2727	VH	EVQLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVASIRS GSGRTYYSDNVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYSGSS DYWGQGLVTVSS	3	1	GFTFS NYGMS SIRSG SGRTY YSDNV KG YDHYS GSSDY	16
				2		20
				3		18
	VL	DVVMTQSPLSLPV TPGEPASISCKSSQS LLDYDGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYK VSNRDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRSGQGT KVEIK	13	1	KSSQS LLDYD GKTYL N KVS NR DS WQGTH FPRS	29
				2		33
				3		38
h4918G	VH	EVQLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSNFGMSWVRQA PGKGLEWVASVRS GGGRTYYSDNVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCVRYDHYSGTS DYWGQGLVTVSS	6	1	GFTFS NFGMS SVRSG GGRTY YSDNV KG YDHYS GTSDY	19
				2		22
				3		24
	VL	DVVMTQSPLSLPV TLGEPASISCKSSQS LMDTDGKTYLNW LLQKPGQSPQRLIY KVS NRESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCW QGTHFPRTFGQGT KVEIK	12	1	KSSQS LMDTD GKTYL N KVS NR ES WQGTH FPRT	32
				2		25
				3		28

[00103] В другом аспекте антитело или фрагмент по изобретению включает переменную область тяжелой цепи (VH), как показано для одной из конструкций в Таблице 1. Антитело или фрагмент также может включать переменную область легкой цепи (VL), как показано для одной из конструкций в Таблице 1А.

[00104] Выравнивание CDR для каждой из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, представленных в Таблице 1А, и CDR из бапинеизумаба (“Bap1”, “hBP”) представлено на Фиг. 19А и 19В. В одном аспекте изобретение направлено на антитело или его фрагмент, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, где CDR1 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO: 16, 19 и 20, где CDR2 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO: 17, 20, 21 22 и 23, и где CDR3 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO:

18, 24, 25. Кроме того, антитело или его фрагмент включает CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO: 26, 29, 31 и 32, где CDR2 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO: 27, 33, 34 и 35, и где CDR3 может быть выбрана из любой из SEQ ID NO: 28, 38 и 39. В каждом из этих вариантов осуществления CDR области тяжелой цепи и CDR области легкой цепи, в комбинации, одновременно не являются SEQ ID NO: 16, 17, 18, 26, 27 и 28.

[00105] Анализ информации, касающейся моделирования белков, для антител, описанных выше, выявил два изменения в CDR, которые, среди прочего, способствовали повышению характеристик авидности/аффинности антител по настоящему изобретению:

CDR-L1: S32Y (замена Ser на Tyr в положении 32) и

CDR-H2: G55S (замена Gly на Ser в положении 54)

[00106] Ожидается, что анти-А β антитела с Tyr в положении 32 в CDR-L1 и Ser в положении 54 в CDR-H2, которые связываются с одним и тем же эпитопом, связываемым антителами, перечисленными в настоящей заявке, будут обладать теми же свойствами, что и перечисленные идентифицированные антитела (см. Таблицу 1А и Фиг. 19А и Фиг. 19В). Описанные антитела, которые не содержат Tyr в положении 32 в CDR-L1 и Ser в положении 55 в CDR-H2, можно модифицировать, чтобы они содержали Tyr в положении 32 в CDR-L1 и Ser в положении 55 в CDR-H2, и можно ожидать, что это придаст связывающие свойства, сходные со свойствами антител, идентифицированных в настоящей заявке.

[00107] Примеры CDR-L1 с Tyr в положении 32 включают SEQ NO: 29 и 31. Примеры CDR-H2 с Ser в положении 55 включают SEQ No: 20 и 21.

[00108] В качестве примеров, антитела, содержащие CDR-L1 с Tyr в положении 32 и CDR-H2 с Ser в положении 55, включают антитела с CDR областями из h2726, h2731, h2727, h2826, h2831, h2926, h2927, h2931, h2929 (см. Таблицу 1А). Дополнительные такие антитела включают антитела, содержащие LC CDR 1, 2, 3 и HC CDR 1, 2, 3, как показано ниже в Таблице 1В.

Таблица 1В

Антитело	НС/ЛС	Последовательности CDR (НС 1, 2, 3; LC 1, 2, 3)	SEQ ID	
h2729	НС	1	GFTFS NYGMS	16
		2	SIRSG SGRTY YSDNV KG	20
		3	YDHYS GSSDY	18
	ЛС	1	RSSQS LVDYD GKTYL N	31
		2	KVSNR DS	33
		3	WQGSF FPRS	39
h2829	НС	1	GFTFS NFGMS	19
		2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
		3	YDHYS GTSDY	24
	ЛС	1	RSSQS LVDYD GKTYL N	31
		2	KVSNR DS	33
		3	WQGSF FPRS	39
h2827	НС	1	GFTFS NFGMS	19

		2	SVRSG SGRTY YSDNV KG	21
		3	YDHYS GTSDY	24
		1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
	LC	2	RVTNR DT	33
		3	WQGTN FPRS	38
		1	GFTFS NYGMS	16
HC-S55/ LC-Y32	HC	2	SIRSG SGRTY YSDNV KG	20
		3	YDHYS GSSDY	18
		1	KSSQS LLDYD GKTYL N	29
	LC	2	LVSKL DS	27
		3	WQGTN FPRT	28

[00109] В свете свойств связывания, определенных для антител, идентифицированных в настоящей заявке, могут быть идентифицированы консенсусные последовательности, которые, как ожидается, будут обеспечивать аналогичные свойства связывания. Например, в вариантах осуществления изобретения антитела или их связывающие фрагменты, которые специфически связываются с пептидом A β , могут включать переменные области тяжелой цепи, имеющие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменные области легкой цепи, имеющие CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как показано ниже:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность GFTFSNX₁GMS, где X₁ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 88);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGSGRITYYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V (SEQ ID NO: 89);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность KSSQSLLDYDGKTYLN (SEQ ID NO: 91);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRDX₃, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой S или T и X₃ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 92).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGTNHFPRX₁, где X₁ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 93).

[00110] В некоторых вариантах осуществления CDR3 легкой цепи включает WQGTNHFPRX₁FX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 94).

[00111] Подобные консенсусные последовательности, которые, как можно ожидать, будут обеспечивать свойства связывания, как у антител, описанных в настоящей заявке, включают переменную область тяжелой цепи, имеющую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, имеющую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как показано ниже:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность

GFTFX₁NX₂GMS, где X₁ представляет собой S или A и X₂ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 95);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGX₂X₃RTYYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V, X₂ представляет собой S или G и X₃ представляет собой S или G (SEQ ID NO: 96);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁SSQSLX₂DX₃DGKTYLN, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой V, M или L и X₃ представляет собой Y, T или S (SEQ ID NO: 97);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRX₃X₄, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой S или T, X₃ представляет собой E или D и X₄ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 98).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGX₁HFPRX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 99).

[00112] В некоторых вариантах осуществления CDR3 легкой цепи включает WQGTHFPRX₁FX₂X₃, где X₁ представляет собой S или T, X₂ представляет собой S или T и X₃ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 100).

[00113] Кроме того, переменные области тяжелой и легкой цепи могут быть по меньшей мере на 75% идентичны переменным областям тяжелой и легкой цепи, представленным в Таблице 1А. Например, переменные области тяжелой и легкой цепи могут быть на 75% идентичны, на 80% идентичны, на 85% идентичны, на 90% идентичны, на 95% идентичны, на 96% идентичны, на 97% идентичны, на 98% идентичны, на 99% идентичны, на 100% идентичны последовательностям VH и/или VL, показанным в Таблице 1А. В различных аспектах любая вариация последовательности в VH и VL может присутствовать за пределами CDR, так что последовательности VH и VL по настоящему изобретению включают CDR, указанные в таблице 1А, но области последовательностей VH и VL вне CDR могут быть по меньшей мере на 75% идентичны областям вне CDR последовательностей VH и VL из Таблицы 1А.

[00114] Например, антитело или фрагмент по изобретению может включать переменную область тяжелой цепи, которая, за исключением CDR-областей, по меньшей мере на 95% идентична одной из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 и 7, и переменную область легкой цепи, которая, за исключением CDR-областей, по меньшей мере на 95% идентична одной из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

[00115] Антитела и фрагменты по изобретению также могут включать константную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 75% идентична SEQ ID NO: 40. Например, константная область тяжелой цепи на 75% идентична, на 80% идентична, на 85% идентична, на 90% идентична, на 95% идентична, на 96% идентична, на 97%

идентична, на 98% идентична, на 99% идентична, на 100% идентична SEQ ID NO: 40.

[00116] Антитела и фрагменты по изобретению также могут включать константную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% идентична SEQ ID NO: 41. Например, константная область тяжелой цепи может быть на 75% идентична, на 80% идентична, на 85% идентична, на 90% идентична, на 95% идентична, на 96% идентична, на 97% идентична, на 98% идентична, на 99% идентична, на 100% идентична SEQ ID NO: 41.

[00117] Вариантные антитела или фрагменты, которые менее чем на 100% идентичны последовательностям, описанным в Таблице 1А (плюс любая константная область), могут отличаться от анти- Аβ-антитела из Таблицы 1А всего по 1-15 аминокислотным остаткам, всего по 1-10 аминокислотным остаткам, например по 6-10, всего по 5, всего по 4, 3, 2 или даже по 1 аминокислотному остатку. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичным зарядом. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи со сходными зарядами. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно, мутации могут быть введены случайным образом по всей или части кодирующей последовательности, например, путем мутагенеза с насыщением, и полученные мутанты могут быть проверены на биологическую активность для выявления мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связывать полипептид Аβ).

[00118] Например, можно вводить мутации только в каркасные области молекул антител. Введенные мутации могут быть молчащими или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. не влиять или оказывать незначительное влияние на способность антитела связывать антиген. Эти типы мутаций могут быть полезны для оптимизации использования кодонов или улучшения продукции антител гибридами. Альтернативно, не являющиеся нейтральными миссенс-мутации могут изменить способность антитела связывать антиген. Специалисты в данной области могут разработать и протестировать мутантные молекулы с желаемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей активности или изменение связывающей активности (например, улучшение антигенсвязывающей активности или изменение специфичности антител). После мутагенеза кодируемый белок можно обычным образом экспрессировать, а функциональную и/или биологическую активность кодируемого белка (например, способность иммуноспецифически связывать по меньшей мере один эпитоп полипептида

Аβ) можно определить с использованием методов, описанных в настоящей заявке, или путем обычной модификации методов, известных в данной области техники.

[00119] В каждом из описанных выше вариантов осуществления антитело или фрагмент по изобретению может представлять собой гуманизированное антитело, как описано в настоящей заявке. Например, антитело может представлять собой человеческое IgG1 антитело. Кроме того, антитело может представлять собой полное антитело, химерное антитело, CDR-привитое антитело или рекомбинантное антитело. Фрагменты антитела могут представлять собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc или Fv. Фрагменты получают методами рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов.

[00120] Можно сказать, что антитело или связывающие фрагменты, вариант или производное, раскрытые в настоящей заявке, связываются с Аβ (или его фрагментом или вариантом) со скоростью диссоциации (k(off)) меньше чем или равной $5 \times 10^{-2} \text{ сек}^{-1}$, 10^{-2} сек^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ или 10^{-3} сек^{-1} . В некоторых вариантах осуществления, можно сказать, что антитело по изобретению связывается с Аβ или его фрагментом или вариантом со скоростью диссоциации (k(off)) меньше чем или равной $5 \times 10^4 \text{ сек}^{-1}$, 10^4 сек^{-1} , $5 \times 10^5 \text{ сек}^{-1}$ или 10^5 сек^{-1} , $5 \times 10^6 \text{ сек}^{-1}$, 10^6 сек^{-1} , $5 \times 10^7 \text{ сек}^{-1}$ или 10^7 сек^{-1} .

[00121] Можно сказать, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, раскрытые в настоящей заявке, связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым в настоящей заявке (например, Аβ), или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации (k(on)) больше чем или равной $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления, можно сказать, что антитело по изобретению связывается с полипептидом-мишенью, раскрытым в настоящей заявке (например, Аβ), или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации (k(on)) больше чем или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$.

[00122] Анти-Аβ антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящей заявке, также могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с Аβ. Аффинность связывания может включать аффинность с константой диссоциации, или K_d, меньше чем $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, 10^{-8} M , $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ или 10^{-15} M .

[00123] Экспрессия рекомбинантных антител

[00124] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным полинуклеотидам, кодирующим антитела, которые при экспрессии включают CDR тяжелой и легкой цепей антител по настоящему изобретению. Примеры полинуклеотидов, которые при экспрессии кодируют полипептидные цепи, содержащие CDR тяжелой и легкой цепей моноклональных антител, представлены в настоящей заявке (например, SEQ ID NO: 42 по SEQ ID NO: 69), которые кодируют полипептиды переменных областей

легкой и тяжелой цепей, а также их CDR, в соответствии с SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 39. Из-за вырожденности кодонов эти последовательности могут быть легко заменены другими полинуклеотидными последовательностями.

[00125] Гуманизированные и человеческие антитела обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные переменные области легкой и тяжелой цепей, которые могут быть связаны с константными областями, встраивают в векторы экспрессии. Легкие и тяжелые цепи можно клонировать в одних и тех же или разных векторах экспрессии. Сегменты ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулина, функционально связаны с контрольными последовательностями в векторе(векторах) экспрессии, которые обеспечивают экспрессию полипептидов иммуноглобулина. Последовательности контроля экспрессии включают, но не ограничиваются этим, промотеры (например, природные или гетерологичные промотеры), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительно последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. После включения вектора в соответствующего хозяина этот хозяин поддерживается в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, а также для сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

[00126] Эти векторы экспрессии обычно реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде составной части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры (например, устойчивости к ампициллину, устойчивости к гигромицину, устойчивости к тетрациклину или устойчивости к неомицину), позволяющие обнаруживать клетки, трансформированные желаемыми последовательностями ДНК.

[00127] Одним из прокариотических хозяев, подходящих для клонирования полинуклеотидов по настоящему изобретению, является *E. coli*. Другие микробы-хозяева, подходящие для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получить векторы экспрессии, которые обычно будут содержать последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество различных хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая промоторная система (*trp*), бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с операторной последовательностью, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

[00128] Другие микробы, такие как дрожжи, также пригодны для экспрессии. *Saccharomyces* является предпочтительным дрожжевым хозяином с подходящими

векторами, имеющими последовательности контроля экспрессии (например, промоторы), точку начала репликации, последовательности терминации и т.п., если желательно. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают, среди прочего, промоторы алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Кроме того, для экспрессии пригодны растения (например, рис, табак).

[00129] Культуру клеток ткани млекопитающих также можно использовать для экспрессии и продукции полипептидов по настоящему изобретению (например, полинуклеотидов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты). Эукариотические клетки могут быть особенно полезны, поскольку в данной области техники был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать гетерологичные белки (например, интактные иммуноглобулины), и они включают клеточные линии СНО, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, предпочтительно миеломные клеточные линии, или трансформированные В-клетки, или гибридомы. Предпочтительно клетки не являются человеческими. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер, а также необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из генов иммуноглобулина, SV40, аденовируса, вируса бычьей папилломы, цитомегаловируса и т.п.

[00130] Последовательности, кодирующие антитела, могут быть встроены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного. Подходящие трансгены включают кодирующие последовательности для легких и/или тяжелых цепей в функциональной связи с промотором и энхансером из специфического гена молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

[00131] Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, и последовательности контроля экспрессии), можно переносить в клетку-хозяина хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, для прокариотических клеток обычно используют трансфекцию с использованием хлорида кальция, тогда как для других клеток-хозяев можно использовать обработку фосфатом кальция, электропорацию, липофекцию, биолистику или вирусную трансфекцию. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают использование полибрена, слияние протопластов, использование липосом, электропорацию и микроинъекцию (см. преимущественно Sambrook et al., выше). Для получения трансгенных животных трансгены можно ввести

микроинъекцией в оплодотворенные ооциты или их можно включить в геном эмбриональных стволовых клеток, а ядра таких клеток перенести в энуклеированные ооциты.

[00132] Когда тяжелые и легкие цепи клонируют на отдельных векторах экспрессии, векторы котрансфицируют для обеспечения экспрессии и сборки интактных иммуноглобулинов. После экспрессии полные антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулинов по настоящему изобретению могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами, используемыми в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки (например, с белком А), колоночную хроматографию, очистку методом ВЭЖХ, гель-электрофорез и т.п. По существу чистые иммуноглобулины с гомогенностью по меньшей мере около 90-95% являются предпочтительными, а наиболее предпочтительны с гомогенностью 98-99% или выше для фармацевтических применений.

[00133] Увеличение числа копий векторов экспрессии, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, желательно как способ увеличения продукции антител или фрагментов антител. В данной области известен ряд методов генетической манипуляции с клетками для этой цели и последующего отбора лучших клеток. Эти методы часто включают стадию «амплификации» для увеличения числа копий встроенного вектора экспрессии для повышения выхода желаемого белка. О способах амплификации сообщалось ранее, например, Bebbington and Hentschel (DNA Cloning Volume III (IRL press, 1987)). Любой из ряда селективируемых маркеров, часто в форме последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме клетки-хозяина и необходимые для их выживания в определенных условиях среды, может быть функционально связан с вектором экспрессии, что может способствовать экспрессии желаемого белка при отборе по селективируемому маркеру. Клетки, отобранные по высокому числу копий, могут быть подвергнуты дополнительным методам амплификации, когда титр белка неприемлемо повышен. Такие методы могут включать воздействие на клетки определенных токсичных препаратов, которые ингибируют селективируемый маркер (например, метотрексат и дигидрофолатредуктаза, метионинсульфоксимин и глутаминсинтаза, множественная лекарственная резистентность/адриамицин). Посредством такого ингибирования могут быть отобраны клеточные популяции с повышенным уровнем экспрессии этого маркера. Это часто приводит к повышенным уровням экспрессии аналогично функционально связанных экспрессионных кассет. Число копий вектора в отдельных клетках, подвергаемых амплификации, оценивают до тех пор, пока не будет достигнуто плато продукции белка, предпочтительно по меньшей мере около $100 \text{ мг/мл}/10^6 \text{ клеток}/24 \text{ часа}$. Клоны, которые растут в результате такой селекции и амплификации, затем подвергают скринингу на титр/выход для выбора наилучшего клона, а затем дополнительно оценивают. В результате такого титрования и скрининга обычно идентифицируют один или небольшое количество клонов для последующей продукции одного или нескольких желаемых белков

и впоследствии используют их по отдельности.

[00134] Фармацевтические композиции

[00135] Известны некоторые способы получения и введения анти-Аβ-антител или их антигенсвязывающих фрагментов, вариантов или производных субъекту, нуждающемуся в этом. Путь введения анти-Аβ-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного может быть, например, периферическим, пероральным, центральным (например, интратекальным, внутрочерепным), парентеральным, ингаляционным или местным.

[00136] Как обсуждается в настоящей заявке, анти-Аβ-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно сформулировать в композицию таким образом, чтобы облегчить введение и способствовать стабильности активного вещества. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат фармацевтически приемлемый нетоксичный стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п. Для целей настоящей заявки под фармацевтически эффективным количеством анти-Аβ-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного следует понимать количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения пользы, например, уменьшения количества амилоидных бляшек в головном мозге, не затрагивая сосудистый амилоид, или сведения к минимуму возникновения микрокровоизлияний при длительном введении анти-Аβ-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления анти-Аβ-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное могут проникать через гематоэнцефалический барьер в количестве, эффективном для уменьшения амилоидных бляшек в головном мозге.

[00137] Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамин сульфат, динатрий гидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

[00138] Предотвращение действия микроорганизмов может достигаться с использованием различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию могут быть включены изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты или соли. Пролонгированную абсорбцию инъекционных

композиций можно обеспечить включением в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00139] Композиции для парентерального введения могут быть в виде однократной болюсной дозы, инфузии или нагрузочной болюсной дозы с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции можно вводить с определенными фиксированными или переменными интервалами, например, один раз в день или по мере необходимости.

[00140] Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Носители для парентерального применения включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорида натрия, раствор лактата Рингера или нелетучие масла. Носители для внутривенного применения включают вещества для восполнения жидкости и питательных веществ, вещества для восполнения электролитов (например, на основе раствора декстрозы Рингера) и т.п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать дополнительные агенты, такие как дофамин или психофармакологические средства, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

[00141] Количество анти-Аβ-антитела или его фрагмента, варианта или производного, смешиваемого с веществами-носителями для получения единичной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от принимающего лечение хозяина и конкретного способа введения. Композицию можно вводить в виде однократной дозы, многократных доз или в течение установленного периода времени в виде инфузии. Схемы введения также могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

[00142] В контексте настоящей заявки термин «периферическое введение» включает, например, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, интраназальное, внутриглазное/вitreальное, ректальное или вагинальное введение. Хотя все эти формы введения явно рассматриваются как находящиеся в рамках настоящего изобретения, примером формы для введения может быть раствор для инъекции, в частности для подкожной, внутривенной или внутриартериальной инъекции, или для капельного введения. Подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер, поверхностно-активное вещество, необязательно стабилизатор и т.д. Препараты для периферического введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии.

Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные агенты, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п.

[00143] Терапевтические композиции по настоящему изобретению обычно по существу не содержат нежелательных примесей. Это означает, что агент обычно по меньшей мере на 50% по массе очищен от мешающих белков и других загрязняющих веществ, возникающих в процессе получения или очистки, но не исключена возможность того, что агент объединяется с избытком фармацевтически приемлемого носителя (носителей) или другого наполнителя, предназначенного для облегчения его использования. Иногда моноклональные антитела (или другие терапевтические агенты) по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% масс/масс очищены от мешающих белков и загрязняющих примесей, образовавшихся в процессе получения или очистки.

[00144] **Лечение пациентов, подлежащих лечению**

[00145] Настоящее изобретение также направлено на лечение болезни Альцгеймера и других амилоидогенетических заболеваний путем введения антител, фрагментов и фармацевтических композиций по настоящему изобретению, вызывающих благоприятный терапевтический ответ у пациента (например, индукцию фагоцитоза Аβ, уменьшение бляшек, ингибирование образования бляшек, уменьшение нейритной дистрофии, нейтрализацию растворимых токсичных видов Аβ, улучшение когнитивной функции и/или индукцию реверсии, лечение или предотвращение снижения когнитивных функций) у пациента, например, для предотвращения или лечения амилоидогенетического заболевания. Изобретение также направлено на применение раскрытых антител и их фрагментов для получения лекарственного средства для лечения или профилактики амилоидогенетического заболевания.

[00146] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы профилактики или лечения заболевания, связанного с амилоидными отложениями Аβ у пациента. В одном аспекте амилоидные отложения находятся в головном мозге или других областях ЦНС. К таким заболеваниям относятся болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) и когнитивные нарушения. Последнее может возникать с другими характерными признаками амилоидогенетического заболевания или без них. Некоторые способы по настоящему изобретению предусматривают введение пациенту эффективной дозы антитела, которое специфически связывается с компонентом амилоидного отложения. Такие способы полезны для профилактики или лечения болезни Альцгеймера у пациентов-людей.

[00147] Способы можно применять как для бессимптомных пациентов, так и для тех, у кого в настоящее время проявляются симптомы заболевания. Антитела, используемые в таких способах, могут быть гуманизированными, человеческими или их фрагментами (например, антигенсвязывающими фрагментами) и могут быть моноклональными или поликлональными, как описано в настоящей заявке. В еще одном аспекте изобретение включает введение антител, полученных от человека, иммунизированного пептидом Аβ, причем этот человек может быть пациентом,

подлежащим лечению антителом.

[00148] В другом аспекте изобретение включает введение антитела с фармацевтическим носителем в виде фармацевтической композиции. Альтернативно, антитело можно вводить пациенту путем введения полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере одну цепь антитела. Полинуклеотид экспрессируется для продукции цепи антитела в организме пациента. Необязательно, полинуклеотид кодирует тяжелую и легкую цепи антитела. Полинуклеотид экспрессируется для продукции тяжелых и легких цепей в организме пациента. В иллюстративных вариантах осуществления контролируют уровень введенного антитела в крови пациента.

[00149] Пациенты, подлежащие лечению, включают лиц с риском заболевания, но у которых отсутствуют его симптомы, а также пациентов, у которых в настоящее время проявляются симптомы. В случае болезни Альцгеймера потенциально любой, кто достаточно долго живет, рискует заболеть болезнью Альцгеймера. Таким образом, способы по изобретению включают введение профилактически общей популяции без необходимости какой-либо оценки риска для конкретного пациента. Способы по изобретению особенно полезны для лиц, которые имеют известный генетический риск болезни Альцгеймера. К таким лицам относятся те, у кого есть родственники, перенесшие это заболевание, и те, чей риск определяется анализом генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры риска развития болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, особенно мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, называемые мутациями Hardy и Swedish, соответственно. Другими маркерами риска являются мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, а также ApoE4, семейный анамнез AD, гиперхолестеринемия или атеросклероз. Лиц, страдающих болезнью Альцгеймера, можно распознать по характерной деменции, а также по наличию факторов риска, описанных выше. Кроме того, существует ряд диагностических тестов для выявления лиц с AD. К ним относятся измерение уровней tau и A β 42 в спинномозговой жидкости. Повышенный уровень tau и пониженный уровень A β 42 указывают на наличие AD. Лица, страдающие болезнью Альцгеймера, также могут быть диагностированы по критериям ADRDA, как описано в разделе «Примеры».

[00150] Лечение бессимптомных пациентов можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30 лет). Однако обычно нет необходимости начинать лечение, пока пациенту не исполнится 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение обычно предполагает многократные дозы в течение определенного периода времени. Лечение можно контролировать, анализируя уровни антител с течением времени. Если ответ падает, показана бустерная доза. В случае потенциальных пациентов с синдромом Дауна лечение можно начинать антенатально, вводя терапевтическое средство матери или вскоре после рождения.

[00151] Детекция *in vivo*

[00152] В другом аспекте, изобретение обеспечивает способы обнаружения амилоидных бляшек и отложений у пациента, страдающего амилоидогенетическим

заболеванием или подверженного риску его развития. Такие способы полезны для диагностики или подтверждения амилоидогенетического заболевания или предрасположенности к нему. Например, способы можно применять для пациентов с симптомами деменции, где наблюдение аномальных амилоидных отложений, вероятно, указывает на болезнь Альцгеймера. Способы также могут применяться для бессимптомных пациентов. Наличие аномальных амилоидных отложений указывает на предрасположенность к симптоматическому заболеванию в будущем.

[00153] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту/пациенту антитела или его фрагмента по настоящему изобретению и детекцию антитела или его фрагмента, связанного с А β .

[00154] Антитело и/или фрагменты антител можно вводить любым подходящим способом, который приводит к доставке в визуализируемую ткань, например, вводить непосредственно в мозг пациента путем внутривенной инъекции или путем внутрочерепной инъекции. Дозировка антитела и/или его фрагмента может включать терапевтическую дозу, субтерапевтическую дозу или сверхтерапевтическую дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент метят, при этом метка включает флуоресцентную метку, парамагнитную метку или радиоактивную метку. Выбор метки зависит от средств детекции. Например, флуоресцентные метки подходят для визуального обнаружения. Использование парамагнитных меток подходит для томографической детекции без хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления радиоактивную метку обнаруживают методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

[00155] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы определения эффективности лечения у субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания. В некоторых вариантах осуществления первый уровень амилоидных бляшек у субъекта измеряют до лечения путем введения антитела или его фрагмента по настоящему изобретению и определяют первое количество антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта. Затем субъекту может быть назначено лечение с последующим измерением второго уровня амилоидных бляшек у субъекта и детекцией антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение, а в некоторых вариантах осуществления отсутствие изменения уровня амилоидных бляшек или небольшое увеличение количества амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение. В некоторых вариантах осуществления уровни амилоидных бляшек можно измерить с использованием способов обнаружения амилоидных бляшек, описанных в настоящем документе.

[00156] В некоторых вариантах осуществления диагностику амилоидогенетического заболевания можно проводить, например, путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых положений из измеренного первого уровня (т.е. исходного уровня) с последующим вторым уровнем амилоидных бляшек у

субъекта. Увеличение со временем указывает на прогрессирование заболевания, отсутствие изменений указывает на , а меньшее количество или менее интенсивные амилоидные бляшки с течением времени указывают на ремиссию.

[00157] Схемы лечения

[00158] Профилактическое применение: фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, у которого имеется предрасположенность к развитию или имеется риск развития болезни Альцгеймера или другого амилоидогенетического заболевания, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала заболевания, в том числе биохимических, гистологических и/или поведенческих симптомов заболевания, его осложнений и промежуточных патологических фенотипов, проявляющихся в процессе развития заболевания. Предрасположенность пациента к амилоидогенетическому заболеванию или риск его развития можно определить, например, по генетическому маркеру, биохимическому маркеру, некоторому наследственному риску или другими способами. При терапевтическом применении композиции или лекарственные средства вводят пациенту с подозрением на такое заболевание или уже страдающему от него в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования симптомов заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы в развитии заболевания.

[00159] В некоторых вариантах осуществления введение агента уменьшает или устраняет когнитивные нарушения у пациентов, у которых еще не развилась характерная для болезни Альцгеймера или другого амилоидогенетического заболевания когнитивная патология. Количество, достаточное для осуществления терапевтического или профилактического лечения, определяется как терапевтически или профилактически эффективная доза. Как в профилактическом, так и в терапевтическом режимах агенты обычно вводят в нескольких дозах до тех пор, пока не будет достигнут достаточный иммунный ответ, где «иммунный ответ» или «иммунологический ответ» включает развитие гуморального (опосредованного антителами) и/или клеточного (опосредованного антигенспецифическими Т-клетками или продуктами их секреции) ответа, направленного против антигена у субъекта, являющегося реципиентом. Такой ответ может быть активным ответом, т.е. индуцированным введением иммуногена, или пассивным ответом, т.е. индуцированным введением иммуноглобулина или антитела или примированных Т-клеток.

[00160] В некоторых вариантах осуществления антитело вводят многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, что определяют по уровню антител к Аβ в крови пациента. В некоторых методах дозировку корректируют для достижения концентрации антител в плазме 1-1000 мкг/мл, а в некоторых методах для достижения 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитело можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота

варьируются в зависимости от периода полужизни антитела в организме пациента. Как правило, человеческие антитела имеют самый длительный период полужизни, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела.

[00161] Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях композиции, содержащие антитела по изобретению или их смесь, вводят пациенту, еще не находящемуся в болезненном состоянии, для повышения резистентности пациента. Такое количество определяется как «профилактически эффективная доза». При таком применении точные количества также зависят от состояния здоровья пациента и общего иммунитета, но обычно находятся в диапазоне от 0,1 до 25 мг/кг на дозу, особенно от 0,5 до 2,5 мг/кг на дозу. Относительно низкую дозу вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца жизни.

[00162] В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая доза (например, примерно 0,5-300 мг/кг антитела на дозу, чаще используются дозы 5-25 мг/кг) через относительно короткие интервалы до тех пор, пока не уменьшится или не остановится прогрессирование заболевания, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен профилактический режим.

[00163] Введение: терапевтические агенты можно вводить путем парентерального, местного, внутривенного, перорального, подкожного, внутриартериального, интракраниального, интраперитонеального, интраназального, внутриглазного или внутримышечного введения для профилактического и/или терапевтического лечения. Внутримышечные инъекции чаще всего вводят в мышцы руки или ноги. В некоторых способах агенты вводят непосредственно в конкретную ткань, где скопились отложения, например, путем интракраниальной инъекции. Внутримышечная инъекция или внутривенная инфузия являются предпочтительными для введения антитела. В некоторых способах определенные терапевтические антитела вводят непосредственно в череп. В некоторых способах антитела вводят в виде композиции или устройства с замедленным высвобождением.

[00164] Агенты по настоящему изобретению необязательно можно вводить в комбинации с другими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении амилоидогенетического заболевания. В случае болезни Альцгеймера и синдрома Дауна, при которых в головном мозге возникают амилоидные отложения, агенты по настоящему изобретению также можно вводить в сочетании с другими агентами, которые увеличивают проникновение агентов по настоящему изобретению через гематоэнцефалический барьер.

[00165] Настоящее изобретение будет более полно описано при помощи следующих неограничивающих примеров.

[00166] **SEQ ID NO. 40: константная область huIgG1**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00167] **SEQ ID NO. 41: константная область hуКаппа**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00168] **SEQ ID NO. 42: нуклеотидная последовательность h2726_VH
 (вариабельная область тяжелой цепи)**

GAAGTGCAGCTTCTGGAGAGCGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGATCC
 CTGAGACTGTCCTGTGCCGCGTCCGGTTTTACCTTCTCCAACACTACGGAATGTCATGG
 GTCCGCCAAGCACCCGGAAAGGGATTGGAATGGGTGGCTTCGATCCGGTCCGGCTC
 GGGACGGACCTACTACTCCGATAACGTCAAGGGCAGATTCACTATTAGCCGGGACA
 ACAGCAAGAATACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
 GTGTATTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCGGGTTCCTCTGATTACTGGGGACAG
 GGGACCCTCGTGACTGTGTCAAGC

[00169] **SEQ ID NO. 43: нуклеотидная последовательность h2726_VL
 (вариабельная область легкой цепи)**

GATGTCGTGATGACCCAGTCACCACTGTCCCTTCCTGTGACTCCCGGAGAACC
 GGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGCTCGATTATGACGGAAAGACCTA
 CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCTGGGCAGAGCCCCAGAGACTGATCTACAAAG
 TGTCCAACAGGGACTCGGGCGTGCCGGACCGCTTCTCGGGGTCCGGTTCGGTACCG
 ACTTTACGCTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
 TGGCAGGGCACTCACTTCCCGCGGACCTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAGATCAA
 G

[00170] **SEQ ID NO. 44: нуклеотидная последовательность h2931_VH
 (вариабельная область тяжелой цепи)**

GAAGTGCAGCTCCTGGAGTCCGGGGGTGGACTGGTGCAGCCCGGGGGCAGC
 CTGAGGCTGAGCTGCGCCGCGTCAGGATTCACCTTCTCCAACCTTCGGAATGTCCTGG
 GTCAGACAGGCCCCGGGAAAGGGCCTTGAATGGGTGGCTAGCGTGCGCTCCGGTTC
 CGGACGGACCTACTACTCGGACAACGTGAAGGGCCGGTTTTACTATCTCCCGGGACA
 ATTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCTTGC GCGCCGAGGATAACCGCA
 GTGTATTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCTGGCACTAGCGATTACTGGGGCCAG
 GGAACCTCTGGTCACCGTGTCTGTC

[00171] **SEQ ID NO. 45: нуклеотидная последовательность h2931_VL
 (вариабельная область легкой цепи)**

GATGTCGTGATGACTCAGTCACCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCTTGGGGGAACC
 CGCCTCGATCTCGTGCAAGAGCTCCAGAGCCTGCTCGACTATGATGGAAAGACCTA

CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCGGGCCAGAGCCCCAGAGGCTGATCTACCGCG
 TGACCAACCGCGACACCGGGGTGCCGGACCGGTTCTCCGGATCCGGCAGCGGCACT
 GACTTCACCCTGAAAATTTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTG
 TTGGCAGGGTACTCACTTTCCACGGTCCTTCGGTCAAGGAACCAAGGTCGAGATCAA
 G

[00172] **SEQ ID NO. 46: нуклеотидная последовательность h2731_VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

GAAGTGCAGCTTCTGGAGAGCGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGGCGGATCC
 CTGAGACTGTCCTGTGCCGCGTCCGGTTTTACCTTCTCCAACCTACGGAATGTCATGG
 GTCCGCCAAGCACCCGGAAAGGGATTGGAATGGGTGGCTTCGATCCGGTCCGGCTC
 GGGACGGACCTACTACTCCGATAACGTCAAGGGCAGATTCATAATAGCCGGGACA
 ACAGCAAGAATACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
 GTGTATTACTGCGTGCCTACGACCACTACTCGGGTTCCTCTGATTACTGGGGACAG
 GGGACCCTCGTGACTGTGTCAAGC

[00173] **SEQ ID NO. 47: нуклеотидная последовательность h2731_VL (вариабельная область легкой цепи)**

GATGTCGTGATGACTCAGTCACCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCTTGGGGAACC
 CGCCTCGATCTCGTGCAAGAGCTCCCAGAGCCTGCTCGACTATGATGGAAAGACCTA
 CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCGGGCCAGAGCCCCAGAGGCTGATCTACCGCG
 TGACCAACCGCGACACCGGGGTGCCGGACCGGTTCTCCGGATCCGGCAGCGGCACT
 GACTTCACCCTGAAAATTTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTG
 TTGGCAGGGTACTCACTTTCCACGGTCCTTCGGTCAAGGAACCAAGGTCGAGATCAA
 G

[00174] **SEQ ID NO. 48: нуклеотидная последовательность h2831_VH (вариабельная область тяжелой цепи)**

GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCCGGGGGATCCC
 TGCGGCTTTCCTGCGCCGCATCCGGCTTCACSTTTTCAAACCTTCGGAATGTCGTGGGT
 CAGACAGGCCCCCGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCTCAGTGCGGTCCGGATCGG
 GTAGAACCTACTACAGCGATAACGTGAAGGGCCGGTTCACGATCTCCCGCGACAAC
 TCCAAGAACACCCTGTACTTGCAAATGAATAGCCTCAGGGCTGAGGATACCGCGGT
 СТАCTACTGTGTGCGCTATGACCACTACACTGGAACCTAGCGACTACTGGGGCCAGGG
 GACCCTCGTGACTGTGTCTGTC

[00175] **SEQ ID NO. 49: нуклеотидная последовательность h2831_VL (вариабельная область легкой цепи)**

GATGTCGTGATGACTCAGTCACCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCTTGGGGAACC
 CGCCTCGATCTCGTGCAAGAGCTCCCAGAGCCTGCTCGACTATGATGGAAAGACCTA
 CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCGGGCCAGAGCCCCAGAGGCTGATCTACCGCG
 TGACCAACCGCGACACCGGGGTGCCGGACCGGTTCTCCGGATCCGGCAGCGGCACT
 GACTTCACCCTGAAAATTTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTG
 TTGGCAGGGTACTCACTTTCCACGGTCCTTCGGTCAAGGAACCAAGGTCGAGATCAA

G

[00176] **SEQ ID NO. 50:** нуклеотидная последовательность h2926_VH
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTCCTGGAGTCCGGGGGTGGACTGGTGCAGCCCCGGGGGCAGC
CTGAGGCTGAGCTGCGCCGCGTCAGGATTCACCTTCTCCAACCTCGGAATGTCCTGG
GTCAGACAGGCCCCGGGAAAGGGCCTTGAATGGGTGGCTAGCGTGCGCTCCGGTTC
CGGACGGACCTACTACTCGGACAACGTGAAGGGCCGGTTTACTATCTCCCGGGACA
ATTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCTTGCGCGCCGAGGATACCGCA
GTGTATTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCTGGCACTAGCGATTACTGGGGCCAG
GGAACCTCTGGTCACCGTGTCGTCA

[00177] **SEQ ID NO. 51:** нуклеотидная последовательность h2926_VL
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACCCAGTCACCACTGTCCCTTCCTGTGACTCCC GGAGAACC
GGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGCTCGATTATGACGGAAAGACCTA
CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCTGGGCAGAGCCCCAGAGACTGATCTACAAAG
TGTC AACAGGGACTCGGGCGTGCCGGACCGCTTCTCGGGGTCCGGTTCCGGTACCG
ACTTTACGCTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
TGGCAGGGCACTCACTTCCCGCGGACCTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAGATCAA
G

[00178] **SEQ ID NO. 52:** нуклеотидная последовательность h4921G VH
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCGGGGGGGGGACTCGTGCAGCCCCGGGGGCTCC
CTGAGACTCTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACTTTTTCAAACCTCGGAATGTCCTGGG
TCCGCCAAGCACCCGGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGCCAGCGTGCGGTCCGGCGGC
GGACGGACTTACTACTCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCAAGGGATAA
CTCCAAGAATACTCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGT
GTACTATTGCGTGCGCTACGACCACTACTCCGGTACCAGCGACTACTGGGGACAGG
GAACCCTTGTGACCGTGTCGAGC

[00179] **SEQ ID NO. 53:** нуклеотидная последовательность h4921G VL
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCGCCCCTCTCCCTGCCTGTGACTCTGGGGGAACC
CGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGTTGGACTCAGACGGAAAGACCT
ACCTTAACTGGCTGCTGCAAAAAGCCAGGACAGAGCCCGCAGAGGCTGATCTACCGC
GTGACCAACCGGGATACGGGAGTGCCGGACAGATTCAGCGGCTCGGGTTCCGGCAC
CGACTTCACCSTCAAAATCTCCCGCGTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTATTACTG
TTGGCAGGGAACCCACTTTCCTCGGACCTTCGGTCAAGGGACTAAGGTCGAAATCA
AG

[00180] **SEQ ID NO. 54:** нуклеотидная последовательность h2826 VH
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCCCGGGGGATCCC

TGCGGCTTTCCTGCGCCGCATCCGGCTTACCTTTTCAAACCTTCGGAATGTCGTGGGT
 CAGACAGGCCCCCGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCTCAGTGCGGTCCGGATCGG
 GTAGAACCTACTACAGCGATAACGTGAAGGGCCGGTTCACGATCTCCCGCGACAAC
 TCCAAGAACACCCTGTACTTGCAAATGAATAGCCTCAGGGCTGAGGATACCGCGGT
 СТАТАCTGTGTGCGCTATGACCACTACACTGGAAGTAGCGACTACTGGGGCCAGGG
 GACCCTCGTGACTGTGTCTGTC

[00181] **SEQ ID NO. 55:** нуклеотидная последовательность h2826 VL
 (вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACCCAGTCACCACTGTCCCTTCCTGTGACTCCCGGAGAACC
 GGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGCTCGATTATGACGGAAAGACCTA
 CCTGAACTGGTTGCTCCAAAAGCCTGGGCAGAGCCCCCAGAGACTGATCTACAAAG
 TGTCCAACAGGGACTCGGGCGTGCCGGACCGCTTCTCGGGGTCCGGTTCCGGTACCG
 ACTTTACGCTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
 TGGCAGGGCACTCACTTCCCGCGGACCTTCGGACAAGGCACCAAGGTTCGAGATCAA
 G

[00182] **SEQ ID NO. 56:** нуклеотидная последовательность h2929 VH
 (вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTCCTGGAGTCCGGGGGTGGACTGGTGCAGCCCGGGGGCAGC
 CTGAGGCTGAGCTGCGCCGCGTCAGGATTCACCTTCTCCAACCTTCGGAATGTCCTGG
 GTCAGACAGGCCCCCGGAAAGGGCCTTGAATGGGTGGCTAGCGTGCGCTCCGGTTC
 CGGACGGACCTACTACTCGGACAACGTGAAGGGCCGGTTTACTATCTCCCGGGACA
 ATTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCTTGCGCGCCGAGGATACCGCA
 GTGTATTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCTGGCACTAGCGATTACTGGGGCCAG
 GAACTCTGGTCACCGTGTCTGTC

[00183] **SEQ ID NO. 57:** нуклеотидная последовательность h2929 VL
 (вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACCCAAAGCCCCCTGTCCCTCCCTGTGACTCCTGGAGAGCC
 GGCGTCCATTTCTGCGCGTCAAGCCAGTCCCTGGTGGACTACGACGGAAAGACCTA
 CCTCAACTGGCTGCTGCAGCGCCCCGGGCAGTCGCCGCAGCGGCTTATCTACAAAGT
 GTCCAACCGCGACTCGGGCGTGCCGGATAGGTTTTTCGGGTTCGGGAAGCGGCACCG
 ACTTCACCCTGAAAATCTCCAGAGTGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
 TGGCAGGGTTCTCACTTCCCACGGTCATATGGCCAAGGGACTAAGGTTCGAAATCAA
 G

[00184] **SEQ ID NO. 58:** нуклеотидная последовательность h3818G VH
 (вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTCCTGGAGTCCGGCGGTGGACTGGTGCAGCCGGGCGGATCCC
 TGAGACTGTCCTGCGCCGCGTCGGGCTTTACTTTTCGCAAATTACGGCATGAGCTGGG
 TCAGACAGGCCCCCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCAGCGTCCGGAGCGGGGG
 ATCCCGGACCTATTACTCCGACAACGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAAGGGACA
 ACTCCAAGAACACCCTGTACTTGCAAATGAACAGCCTTCGGGCTGAGGATACTGCC

GTGTACTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCCGGATCCTCGGATTACTGGGGACAG
GGAACCCTCGTGACCGTGTTCATCG

[00185] **SEQ ID NO. 59:** нуклеотидная последовательность **h3818G VL**
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCGCCCTCTCCCTGCCTGTGACTCTGGGGGAACC
CGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGATGGACACCGACGGAAAGACCT
ACCTTAACTGGCTGCTGCAAAAAGCCAGGACAGAGCCCGCAGAGGCTGATCTACAAA
GTGTCAAACCGGGAGTCCGGAGTGCCGGACAGATTCAGCGGCTCGGGTTCCGGCAC
CGACTTCACCCSTCAAAATCTCCCGCGTTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTATTACTG
TTGGCAGGGAACCCACTTTCCTCGGACCTTCGGTCAAGGGACTAAGGTCGAAATCA
AG

[00186] **SEQ ID NO. 60:** нуклеотидная последовательность **h2927 VH**
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTCCTGGAGTCCGGGGGTGGACTGGTGCAGCCCGGGGGCAGC
CTGAGGCTGAGCTGCGCCGCGTCAGGATTCACCTTCTCCAACCTTCGGAATGTCCTGG
GTCAGACAGGCCCGGGAAAGGGCCTTGAATGGGTGGCTAGCGTGCGCTCCGGTTC
CGGACGGACCTACTACTCGGACAACGTGAAGGGCCGGTTTACTATCTCCCGGGACA
ATTCGAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCTTGCGCGCCGAGGATACCGCA
GTGTATTACTGCGTGCGCTACGACCACTACTCTGGCACTAGCGATTACTGGGGCCAG
GGAACCTCTGGTCACCGTGTTCGTCA

[00187] **SEQ ID NO. 61:** нуклеотидная последовательность **h2927 VL**
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCACCGCTCTCCCTCCCTGTGACCCCGGGCGAACC
AGCGTCGATCTCCTGCAAGAGCAGCCAATCATTGCTGGACTACGACGGAAAGACCT
ATCTTAACTGGCTGCTGCAGAAGCCCGGGCAGAGCCCGCAGCGCCTGATCTACAAA
GTGTCCAACAGAGACTCCGGAGTGCCTGATAGGTTCTCGGGTTCCGGCTCCGGTACC
GACTTCACTCTGAAAATTTCCCGGGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
TGGCAGGGCACCCACTTCCCCCGGTCGTTTGGACAAGGGACCAAGGTCGAGATCAA
G

[00188] **SEQ ID NO. 62:** нуклеотидная последовательность **h49K3G VH**
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCGGGGGGGGGACTCGTGCAGCCCGGGGGCTCC
CTGAGACTCTTTGTGCCGCTCCGGCTTCACTTTTTCAAACCTTCGGAATGTCCTGGG
TCCGCCAAGCACCGGGAAAGGGTCTGGAATGGGTCCGAGCGTGCGGTCCGGCGGC
GGACGGACTTACTACTCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCAAGGGATAA
CTCCAAGAATACTCTGTAATTGCAAATGAACTCGCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGT
GTAATAATTGCGTGCGCTACGACCACTACTCCGGTACCAGCGACTACTGGGGACAGG
GAACCSTTGTGACCGTGTTCGAGC

[00180] **SEQ ID NO. 63:** нуклеотидная последовательность **h49K3G VL**
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCGCCCCTCTCCCTGCCTGTGACTCTGGGGGAACC
 CGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGTTGGACTCAGACGGAAAGACCT
 ACCTTAACTGGCTGCTGCAAAAAGCCAGGACAGAGCCCCGCAGAGGCTGATCTACAAA
 GTGTCAAACCGGGATTCCGGAGTGCCGGACAGATTCAGCGGCTCGGGTTCCGGCAC
 CGACTTCACCTCAAAAATCTCCCGCGTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTATTACTG
 TTGGCAGGGAACCCACTTTCCTCGGACCTTCGGTCAAGGGACTAAGGTCGAAATCA
 AG

[00190] **SEQ ID NO. 64:** нуклеотидная последовательность **h4917G VH**
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCGGGGGGGGGACTCGTGCAGCCCCGGGGGCTCC
 CTGAGACTCTTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACTTTTTCAAACCTTCGGAATGTCCTGGG
 TCCGCCAAGCACCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTCCGAGCGTGCAGGTTCCGGCGGC
 GGACGGACTTACTACTCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCAAGGGATAA
 CTCCAAGAATACTCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGT
 GTACTATTGCGTGCCTACGACCACTACTCCGGTACCAGCGACTACTGGGGACAGG
 GAACCSTTGTGACCGTGTGCGAGC

[00191] **SEQ ID NO. 65:** нуклеотидная последовательность **h4917G VL**
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCGCCCCTCTCCCTGCCTGTGACTCTGGGGGAACC
 CGCGTCCATTTTCGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGTTGGACTCAGACGGAAAGACCT
 ACCTTAACTGGCTGCTGCAAAAAGCCAGGACAGAGCCCCGCAGAGGCTGATCTACAAA
 GTGACCAACCGGGAGTCCGGAGTGCCGGACAGATTCAGCGGCTCGGGTTCCGGCAC
 CGACTTCACCTCAAAAATCTCCCGCGTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTATTACTG
 TTGGCAGGGAACCCACTTTCCTCGGTCATTCGGTCAAGGGACTAAGGTCGAAATCAA
 G

[00192] **SEQ ID NO. 66:** нуклеотидная последовательность **h2727 VH**
(вариабельная область тяжелой цепи)

GAAGTGCAGCTTCTGGAGAGCGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGATCC
 CTGAGACTGTCCTGTGCCGCTCCGGTTTTACCTTCTCCAACCTACGGAATGTCATGG
 GTCCGCCAAGCACCCGGAAGGGATTGGAATGGGTGGCTTCGATCCGGTCCGGCTC
 GGGACGGACCTACTACTCCGATAACGTCAAGGGCAGATTCATAATAGCCGGGACA
 ACAGCAAGAATACCCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
 GTGTATTACTGCGTGCCTACGACCACTACTCGGGTTCCTCTGATTACTGGGGACAG
 GGGACCSTCGTGAAGTGTGCAAGC

[00193] **SEQ ID NO. 67:** нуклеотидная последовательность **h2727 VL**
(вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCACCGCTCTCCCTCCCTGTGACCCCCGGGCGAACC
 AGCGTTCGATCTCCTGCAAGAGCAGCCAATCATTGCTGGACTACGACGGAAAGACCT
 ATCTTAACTGGCTGCTGCAGAAGCCCCGGGCAGAGCCCCGCAGCGCCTGATCTACAAA
 GTGTCCAACAGAGACTCCGGAGTGCCCTGATAGGTTCTCGGGTTCCGGCTCCGGTACC

GACTTCACTCTGAAAATTTCCCGGGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGT
 TGGCAGGGCACCCACTTCCCCCGGTCGTTTTGGACAAGGGACCAAGGTCGAGATCAA
 G

[00194] **SEQ ID NO. 68:** нуклеотидная последовательность h4918G VH
 (вариабельная область тяжелой цепи)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCGGGGGGGGGACTCGTGCAGCCCCGGGGGCTCC
 CTGAGACTCTTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACTTTTTCAAACCTCGGAATGTCCTGGG
 TCCGCCAAGCACCCGGGAAAGGGTCTGGAATGGGTCCGACGCGTGCAGTCCGGCGGC
 GGACGGACTTACTACTCCGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCAAGGGATAA
 CTCCAAGAATACTCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGT
 GTACTATTGCGTGCCTACGACCACTACTCCGGTACCAGCGACTACTGGGGACAGG
 GAACCCTTGTGACCGTGTGCGAGC

[00195] **SEQ ID NO. 69:** нуклеотидная последовательность h4918G VL
 (вариабельная область легкой цепи)

GATGTCGTGATGACTCAGTCGCCCTCTCCCTGCCTGTGACTCTGGGGGAACC
 CGCGTCCATTTCTGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGATGGACACCGACGGAAAGACCT
 ACCTTAACTGGCTGCTGCAAAAAGCCAGGACAGAGCCCGCAGAGGCTGATCTACAAA
 GTGTCAAACCGGGAGTCCGGAGTGCCGGACAGATTCAGCGGCTCGGGTCCGGCAC
 CGACTTCACCTCAAAATCTCCCGCGTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTATTACTG
 TTGGCAGGGAACCCACTTTCCTCGGACCTTCGGTCAAGGGACTAAGGTCGAAATCA
 AG

[00196] **SEQ ID NO. 70:** тяжелая цепь адуканумаба:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
 FDGTKKYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYY
 MDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00197] **SEQ ID NO. 71:** легкая цепь адуканумаба:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 TLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00198] **SEQ ID NO. 72:** HC (тяжелая цепь) бапинеизумаба:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSG
 GGRYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVTHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD
 KTHTCPPC

PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00199] **SEQ ID NO. 73: VH (вариабельная область тяжелой цепи)**
бапиейзумаба

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSG
GGRTYYSDNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQ
GTLVTVSS

[00200] **SEQ ID NO: 16: VH CDR1** GFTFSNYGMS

[00201] **SEQ ID NO: 17: VH CDR2** SIRSGGGRTYYSDYDYNVKG

[00202] **SEQ ID NO: 18: VH CDR3** YDHYSGSSDY

[00203] **SEQ ID NO. 77: LC (легкая цепь) бапиейзумаба**

DVVMQTQSPLSLPVTTPGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00204] **SEQ ID NO. 78: VL (вариабельная область легкой цепи) бапиейзумаба**

DVVMQTQSPLSLPVTTPGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIK

[00205] **SEQ ID NO: 26: VL CDR1** KSSQSLDSDGKTYLN

[00206] **SEQ ID NO: 27: VL CDR2** LVSSKLDS

[00207] **SEQ ID NO: 28: VL CDR3** WQGTHFPRT

[00208] **SEQ ID NO. 82: аминокислотная последовательность HC**
гантенерумаба:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINAS
GTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVR
YFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00209] **SEQ ID NO. 83: аминокислотная последовательность LC**
гантенерумаба:

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00210] **SEQ ID NO. 84: Бета-амилоид (A β) 1-42:**

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

[00211] **SEQ ID NO. 85: белок-предшественник бета-амилоида (A β):**

MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMHMNVQNGKW
 DSDPSGKTCTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHF
 VIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYG
 MLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDVWWGGADTDYADGSEDKVV
 EVAEEEEVAEVEEEEEADDEDEDGDEVEEEAEPEYEEATERTTTSIATTTTTTTESVEEV
 VREVCSEQAETGPCRAMISRWFVDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGS
 AMSQSLKTTQEPLARDPVKLPTTAASTPDAVDKYLETGPDENEHAHFQKAKERLEAK
 HRERMSQVMREWEAEERQAKNLPKADKKA VIQHFQEKVESLEQEANERQQLVETHM
 ARVEAMLNDRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHV
 RMVDPKKAQAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNVPAVAEEIQDEVDELQKEQNY
 DDVLANMISEPRISYGN DALMPSLTETKTTVELLPVNGEFLDDLQPWHSFGADSV PAN
 TENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFF
 AEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKKQYTSIHGVEVDAAVTPEERHLS
 KMQQNGYENPTYKFFEQMQN

[00212] **SEQ ID NO. 86: нуклеотидная последовательность константной области huIgG1**

GCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAC
 TTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCGTGAAGGACTACTCCCCGAGCCGG
 TCACCGTGTCTCTGGAACCTCGGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCTGCGG
 TGCTGCAGTCTCTCCGGGCTCTACTCGCTGTCAAGCGTGGTCACCGTCCCGAGCTCAT
 CCCTGGGTACTCAGACCTACATTTGCAACGTGAACCACAAACCTTCCAACACCAAGG
 TCGACAAGAAAGTGGAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCGTGT
 CCCGCCCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTCTTCCCGCCTAAGCCGAAG
 GACACTCTGATGATCTCGAGAACCCTGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCC
 CACGAGGATCCGGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTCCATAA
 CGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAACAGTACAACCTCAACTACCGGGTGGTGTGAG
 TGCTGACCGTGTGTCACCAAGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTC
 TCCAACAAGGCGCTGCCGGCCCCCATTGAAAAGACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCA
 GCCCCGGGAACCACAGGTCTACACCTTGCCCCCTTCCCGGGAGGAAATGACCAAGA
 ACCAAGTGTGCTGACGTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCATCTGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCGGAACAACAACACTACAAGACTACCCCGCCTGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCGTTCTTCTGTATTCCAAGCTCACCGTGGATAAGTCCAGATGG
 CAGCAGGGCAATGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAACCACTA
 CACTCAGAAATCACTGTCCCTTTCCCCCGGAAAGTAA

[00213] **SEQ ID NO. 87: нуклеотидная последовательность константной области huКаппа**

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT

GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC
 CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
 CCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

[00214] **Примеры**

[00215] Следующие примеры включены для иллюстрации способов, раскрытых в настоящей заявке. Некоторые аспекты следующих примеров описаны на примере методов и процедур, которые, как было обнаружено или предполагается соавторами настоящего изобретения, хорошо работают на практике, как раскрыто в настоящей заявке. На основании настоящего раскрытия и общего уровня квалификации в данной области специалистам будет понятно, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации и что можно использовать множество изменений, модификаций и вариантов без отступления от объема раскрытия.

[00216] «Адуканумаб» или «Adu», используемый в этих экспериментах, относится к антителу с тяжелой цепью SEQ ID NO: 70 и легкой цепью SEQ ID NO: 71, как указано в публикации патента США № US 2015/0315267 и публикации PCT WO 2014/089500.

[00217] «BAN-2401» и «гантенерумаб», используемые в этих экспериментах, относятся к антителу с тяжелой цепью SEQ ID NO: 79 и легкой цепью SEQ ID NO: 80, как указано, например, в европейском патенте № EP 1960428B1.

[00218] В следующих способах профили связывания антител с агрегированным или фибриллярным A β охарактеризованы методом ELISA, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и иммуногистохимии (ИНС). Способность опосредовать клиренс фагоцитарных бляшек оценивают *ex vivo* в головном мозге трансгенных мышей APP/PS1, а также в головном мозге при AD с первичной мышшиной микроглией путем количественного определения методом иммунофлуоресценции, ELISA и MSD, а нейтрализацию нейронального связывания A β -олигомера оценивают в первичных культурах гиппокампа крысы.

[00219] Представленные результаты: по сравнению с другими терапиями антителами, нацеленными на N-конец A β (бапинеизумаб, адуканумаб), mAb по изобретению проявляли бóльшую кажущуюся аффинность к агрегированному и фибриллярному A β в конкурентных или стандартных анализах связывания ELISA. Повышенная avidность mAb по настоящему изобретению в отношении фибриллярного A β была подтверждена определением равновесной кинетики связывания методом SPR, указывающим на avidность в 5-11 раз выше, чем у адуканумаба, из-за более медленной кинетики диссоциации. ИНС оценки доза-ответ на замороженных срезах головного мозга человека с AD показали бóльшую кажущуюся аффинность и связывание с бляшками, чем у адуканумаба, независимо от тестируемой ткани конкретного AD донора. В анализах активности *ex vivo* было показано, что mAb по настоящему изобретению значительно способствуют уменьшению A β бляшек за счет микроглиального фагоцитоза в ткани мыши

APP/PS1 и блокируют связывание растворимого олигомера A β с первичными нейронами крысы в зависимости от концентрации. В функциональных анализах *ex vivo* с мозгом человека с AD было показано, что mAb по изобретению значительно облегчают клиренс пироглутамилированного A β , посттрансляционно модифицированного компонента сенильных бляшек.

[00220] Пример 1. Конструирование антител к A β

[00221] Антитело к A β бапинеизумаб (hBP) представляет собой гуманизованное антитело, полученное из родительского мышиного антитела 3D6. Здесь был применен многосторонний подход для создания антител, превосходящих hBP. Была проанализирована гуманизация hBP, и было установлено, что гуманизация легкой цепи может быть оптимизирована.

[00222] Был проведен поиск белковых последовательностей в базе данных PDB [Deshpande et al, 2005], чтобы найти структуры, которые могли бы обеспечить грубую структурную модель hBP. Кристаллическую структуру hBP fab PDB код 4HIX [Miles, et al., 2013] использовали как для Vh, так и для Vk структуры, поскольку она имела приемлемое разрешение (2,2 Å) и точное соответствие последовательности с Vh и Vk hBP, сохраняя те же канонические структуры для петель.

[00223] IMGT/DomainGapAlignment применяли для VL hBP в качестве входных последовательностей. Последовательность гена VK зародышевой линии человекаIGHV2-30*02 является наиболее близкой к VL hBP. Каркасы VL hBP обладают высокой степенью сходства последовательностей с соответствующими каркасными областями IGHV2-30*02. Таким образом, каркасные области IGHV2-30*02 VL были выбраны в качестве направляющей последовательности для дальнейшей оптимизации каркасных областей hBP. Кроме того, три остатка в CDR-L2, которые не образуют прямого контакта с антигеном в соответствии с трехмерной структурой hBP, также были заменены последовательностью зародышевой линии, что привело к следующим изменениям: L50K, K53N и L54R (Kabat).

[00224] Три различные варианта VL были сконструированы путем включения каркасных остатков зародышевой линии человека в последовательность VL hBP. Канонические или граничные остатки не были изменены. Выравнивание сконструированного варианта VK показано на Фиг. 1.

[00225] Кроме того, на основании наблюдений структуры, согласно которому P15 расположен на изгибе, а ген зародышевой линии имеет Leu в этом положении, P15L был протестирован в одном варианте вариабельной области легкой цепи.

[00226] На основании наблюдений трехмерной структуры были сконструированы замены ряда остатков в CDR легкой и тяжелой цепей и каркасе. Были созданы мутантные варианты VL и VH, в общей сложности тридцать один для легкой цепи и тридцать два для тяжелой цепи, которые были протестированы на связывание в первом раунде рационального дизайна. Мутации, показавшие улучшенное связывание, объединяли во втором раунде рационального дизайна. Кроме того, в конструкцию также были включены

новые мутации на основании дальнейшего анализа структуры.

[00227] Мутагенез на основе рационального дизайна осуществляли для следующих положений в CDR-H1: T28, S30, N31, Y32 и G33 (Kabat). Что касается положений в CDR-H2, I51, G53, G54, T57, S60, D61 и N62 также были мутированы (Kabat). CDR-H3 положения D96, H97, S99, S100a и Y102 подвергались рациональному мутагенезу (Kabat).

[00228] Для вариабельной области легкой цепи были испытаны множественные замены в CDR-L1 в положениях K24, L27c, D27d и S27e (Kabat). Положения K53 и L54 в CDR-L2 легкой цепи подвергались направленному и ограниченному мутагенезу (Kabat). Положения в CDR-L3 не подвергались заменам.

[00229] Несколько выбранных положений в каркасных областях также подвергались рациональному мутагенезу как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи.

[00230] Пятьдесят семь дополнительных вариантов тяжелой цепи и тридцать три легкой цепи были сконструированы и проанализированы с использованием программы Atum GPSpro, которая анализирует базу данных вариабельных областей тяжелых и легких цепей человека и, на основании компьютерной информации, предлагает специфические для искомой последовательности изменения.

[00231] Для вариабельного домена тяжелой цепи был сконструирован и проанализирован ряд замен в положениях A24, S25, G26, F27, T28, F29, S30, N31, Y32, G33 и M34 (Kabat). Большинство из этих положений находились в CDR-H1. Подобным образом, многие из CDR-H2 остатков подвергались мутагенезу, например положения A49, S50, I51, R52, S52a, G53, G54, G55, R56, T57, Y58, Y59, S60, D61, N62, V63 и K64 (Kabat). Кроме того, осуществляли множество замен аминокислот в CDR-H3, например в положениях V93, R94, Y95, D96, H97, Y98, S99, G100, S100a, S100b, D101 и Y102 (Kabat).

[00232] Множественные замены были также сконструированы для CDR-L1 вариабельной области легкой цепи в положениях K24, S25, S26, Q27, S27a, L27b, L27c, D27d, S27e, D28, G29, K30, T31, Y32, L33 и N34 (Kabat). Для CDR-L2 мутагенез осуществляли в положениях L50, V51, S52, K53, L54, D55 и S56 (Kabat). Большинство положений CDR-L3, таких как Q90, G91, T92, H93, F94, P95, R96 и T97, также были рационально заменены несколькими аминокислотами (Kabat).

[00233] Все варианты антитела, полученные в результате рационального, а также GPSpro дизайна, анализировали на экспрессию, точку плавления (T_m), аффинность и авидность. Восемь антител из рационального дизайна и шесть антител из обнаруженных с использованием компьютерной программы, были отобраны для дальнейшего исследования на основе анализов, указанных выше.

[00234] **Пример 2. Определение отношения IC_{50} с использованием конкурентных анализов ELISA.**

[00235] Для определения IC_{50} для антитела по изобретению использовали анализ, основанный на конкуренции (ингибировании) связывания меченого антитела с покрытым антигеном планшетом.

[00236] Для получения фибрилл полипептиды A β 1-42, предварительно

обработанные HFIP (гексафторизопропанолом) и высушенные, ресуспендировали в DMSO до 5 мМ, затем далее разбавляли до 100мкМ при помощи 10 мМ HCl. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24ч и затем центрифугировали для разделения растворимых и фибриллярных видов. Клеточный осадок ресуспендировали в 1x D-PBS до исходного объема и обрабатывали ультразвуком перед использованием.

[00237] Планшеты покрывали 0,5 мг/мл фибриллярного A β 42 и блокировали, например при помощи 1% BSA/PBS. Семь 3-кратных разведений hBP, начиная с 150 мкг/мл (конечная концентрация 75 мкг/мл), и четыре 3-кратных разведения испытываемого антитела, начиная с 20 мкг/мл (конечная концентрация 10 мкг/мл), полученных в 0,1%BSA/PBS, добавляли в лунки в трех повторах, по 50 мкл на лунку. 50 мкл hBP-биотина при 0,75 мкг/мл (конечная концентрация 0,35 мкг/мл), полученного в 0,1%BSA/PBS, добавляли во все лунки и планшеты инкубировали 2 часа при комнатной температуре, затем их промывали 3x TTBS. Затем добавляли 100 мкл GE стрептавидин-HRP, разведенного 1/10000, и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты затем промывали 6x TTBS. Подготавливали свежий о-фенилендиамин дигидрохлоридный (OPD) субстрат Thermo Fisher в соответствии с инструкциями изготовителя и добавляли по 100 мкл на лунку. Реакционную смесь инкубировали в течение 15 минут и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N H₂SO₄. Образцы считывали при 490 нм на Spectromax. Фиг. 2, Фиг. 3 и Фиг. 4 иллюстрируют графики конкурентного анализа ELISA для 4918, 4917, 4921, 3818, 49human3, 2931 и контроля бапинеизумаба (Фиг. 2), для 2926, 2831, 2927, 2726, 2731, 2826 и контроля бапинеизумаба (Фиг. 3) и для 2727, 2929 и контроля бапинеизумаба (Фиг. 4). Значение IC₅₀ для каждого испытываемого антитела делили на значение IC₅₀ для hBP с получением отношения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC₅₀). Отношение меньше единицы указывает на лучшую эффективность, чем у hBP. См. Таблицу 2.

Таблица 2

Антитело	Конкурентный ELISA на фибриллярном A β 42 Отношение значений IC ₅₀ (испытываемое антитело:hBP)
h2931	0,59
h2731	0,61
h2726	0,68
h2831	0,77
h2926	0,99
h4921	1,01
h2826	1,10
h2929	1,16
h3818	1,18
h2927	1,60
h49_hum3	2,16
h49_VK17	2,69
h2727	3,06
h4918	ND

hBP	1
-----	---

[00238] **Пример 3. Определение активности моноклональных антител с использованием конкурентного ELISA**

[00239] Связывающую активность некоторых моноклональных антител по настоящему изобретению и hBP измеряли по их способности конкурировать с биотинилированным бапинейзумабом, связывание с агрегированным A β 42 оценивали с использованием конкурентного ELISA. Один мг A β 42 добавляли к 1 мл диH₂O, энергично встряхивали и помещали в шейкер-качалку на 48 часов при комнатной температуре. Планшеты покрывали 0,5 мг/мл гетерогенной смеси A β 42 агрегата и блокировали, например при помощи 1% BSA/PBS. Семь 3-кратных разведений hBP, начиная с 150 мкг/мл (75 мкг/мл после разведения hBP-биотином), и четыре 3-кратных разведения испытываемого антитела, начиная с 20 мкг/мл (10 мкг/мл после разведения hBP-биотином), добавляли в лунки в трех повторах, по 50 мкл на лунку. 50 мкл hBP-биотина при 0,75 мкг/мл (0,35 мкг/мл после разведения) добавляли во все лунки и планшеты инкубировали 2 часа при комнатной температуре, затем их промывали 3х TTBS. Затем добавляли 100 мкл GE стрептавидин-HRP, разбавленного 1/10000, и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты промывали TTBS шесть раз. Подготавливали свежий о-фенилендиамин дигидрохлоридный (OPD) субстрат Thermo Fisher в соответствии с инструкциями изготовителя, и добавляли при 100 мкл на лунку. Реакционную смесь инкубировали в течение 15 минут и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N H₂SO₄. Образцы считывали при 490 нм на Spectromax. Фиг. 5А представляет график конкурентного анализа ELISA для 2931, 2731 и контроля бапинейзумаба (Var1); Фиг. 5В представляет график конкурентного анализа ELISA для 2726, 2831 и контроля бапинейзумаба. Фиг. 20А представляет график конкурентного анализа ELISA для 2931, 2731 и контроля бапинейзумаба (данные показаны в Таблице 3, строки 1-2); Фиг. 20В представляет график конкурентного анализа ELISA для 2831, 2726 и контроля бапинейзумаба (данные показаны в Таблице 3, строки 4-5). Для Фиг. 20А и Фиг. 20В кривые и полученные значения IC₅₀ представляют собой нелинейную подгонку данных методом наименьших квадратов с тремя параметрами. Отдельные точки представляют собой среднее значение для образцов, испытанных в трех повторах (коэффициент вариации <20%).

Таблица 3

mAb	Var1	h2931	h2731
IC ₅₀ (мкг/мл mAb)	15,04	6,901	5,024
mAb	Var1	h2726	h2831
IC ₅₀ (мкг/мл mAb)	21,83	9,049	9,907

[00240] Результаты демонстрируют, что антитела 2931, 2731, 2726 и 2831 показали более высокую активность по сравнению с hBP; ~2-4 более низкие значения IC₅₀, чем у hBP.

[00241] **Пример 4. Определение характеристик гуманизированных mAb или**

Fab с использованием системы VIAcore

[00242] Для сравнения характеристик связывания гуманизированных антител или гуманизированных антигенсвязывающих фрагментов (Fab) с рекомбинантными A β ₁₋₄₂ фибриллами осуществляли анализ с использованием VIAcore T200 (GE Life Sciences).

[00243] Для получения фибрилл полипептиды A β ₁₋₄₂, предварительно обработанные HFIP (гексафторизопропанолом) и высушенные, ресуспендировали в DMSO до 5 мМ, затем далее разбавляли до 100мкМ раствором 10 мМ HCl. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24ч, а затем центрифугировали для разделения растворимых и фибриллярных видов. Клеточный осадок ресуспендировали в D-PBS до исходного объема и обрабатывали ультразвуком перед использованием.

[00244] Фибриллы иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare Life Sciences) посредством иммобилизации по амино-группе до уровня, обеспечивающего максимальное связывание аналита приблизительно 100 RU. Различные концентрации антител или Fab-фрагментов (в диапазоне от 1нМ до 100нМ) пропускали через связанный лиганд со скоростью 30 мкл/мин в рабочем буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл BSA) в течение времени ассоциации 300 сек и времени диссоциации 1200 сек. Регенерацию поверхности чипа осуществляли двумя короткими инъекциями 10 мМ глицин-HCl при pH 1,7. Из данных вычитали значения холостой пробы как для сенсора, не содержащего лиганд, так и для концентрации аналита 0 нМ. Анализ осуществляли с использованием точного соответствия 1:1 и программы VIAcore Insight Evaluation (v2.0) с объемным показателем преломления, установленным на ноль RU. Данные скорости диссоциации (k_{diss} ; kd) показаны в Таблице 4 (Fab-фрагменты) и Таблице 6 (антитела).

[00245] Подобным образом, для h2726, h2731, h2831 и h2931 Fab-фрагментов и антител можно наблюдать низкие константы диссоциации по сравнению с адуканумабом, который продемонстрировал значительно более высокую константу диссоциации.

Таблица 4

Раствор аналита вводимые переменные 1,	Связывание 1:1 ka (1/Мс)	kd (1/с)	Кажущаяся KD (М)	Rmax (RU)
h2726	1,29e+5	2,59e-4	2,01e-9	133,5
h2731	1,29e+5	2,89e-4	2,24e-9	134,0
h2831	1,08e+5	2,48e-4	2,31e-9	127,1
h2931	1,23e+5	1,99e-4	1,62e-9	132,0
hBP	1,12e+5	6,00e-4	5,34e-9	116,1

[00246] **Пример 5. Исследование кажущейся аффинности гуманизированных mAb с использованием VIAcore**

[00247] Определение аффинности связывания анти-A β -кандидатов с A β ₁₋₂₈

(Bachem, Torrance, CA) осуществляли с использованием Biacore T200. Анти-человеческое Fc антитело иммобилизовали на сенсорном чипе CM3 (GE Healthcare Life Sciences) посредством иммобилизации по amino-группе и использовали для захвата антител к A β .

[00248] Различные концентрации A β ₁₋₂₈ (аналит, в диапазоне концентраций от 100 нМ до 0,39 нМ, серийно разведенный 2-кратно на каждой стадии разведения) пропускали через захваченный лиганд при 50 мкл/мин в рабочем буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл BSA) с временем ассоциации 240 сек и временем диссоциации 900 сек. Из данных вычитали значения холостой пробы как для нерелевантного сенсора, не содержащего лиганд, так и для буфера с концентрацией аналита 0 нМ. Анализ осуществляли с использованием точного соответствия 1:1 и программы Biacore Evaluation (v3.0).

[00249] Кажущиеся константы диссоциации (KD) показаны в Таблице 5, где mAb по изобретению продемонстрировали аффинность связывания 4-7 нМ в отношении A β ₁₋₂₈ мономера. Сенсограммы связывания при концентрациях от 0,39 нМ до 100 нМ показаны на Фиг. 6A (h2726), Фиг. 6B (h2731), Фиг. 6C (h2831) и Фиг. 6D (h2931).

Таблица 5

Раствор для захвата, вводимые переменные	Раствор аналита 1	Связывание 1:1 ka (1/Мс)	kd (1/с)	Кажущаяся KD (М)	Rmax (RU)
h2726	A β ₁₋₂₈	9,23e+4	5,55e-4	6,01e-9	87,0
h2731	A β ₁₋₂₈	1,19e+5	5,95e-4	5,01e-9	78,3
h2831	A β ₁₋₂₈	7,31e+4	5,08e-4	6,95e-9	88,0
h2931	A β ₁₋₂₈	9,47e+4	4,12e-4	4,35e-9	76,1

[00250] **Пример 6. Исследование кажущейся аффинности гуманизированных mAb с использованием анализа Biacore**

[00251] Для сравнения характеристик связывания гуманизированных антител с фибриллами рекомбинантного A β ₁₋₄₂ осуществляли анализ с использованием Biacore T200.

[00252] Для получения фибрилл полипептиды A β ₁₋₄₂ предварительно обработанные HFIP (гексафторизопропанолом) и высушенные, ресуспендировали в DMSO до 5 мМ, затем далее разбавляли до 100 мкМ раствором 10 мМ HCl. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24ч, а затем центрифугировали для разделения растворимых и фибриллярных видов. Клеточный осадок ресуспендировали в 1x D-PBS до исходного объема и обрабатывали ультразвуком перед использованием.

[00253] Фибриллы иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare Life Sciences) посредством иммобилизации по amino-группе до уровня, обеспечивающего максимальное связывание аналита, приблизительно 50 RU. Различные концентрации антител (в диапазоне от 0,411 нМ до 100 нМ) пропускали через связанный лиганд при 30 мкл/мин в рабочем буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл BSA) с временем ассоциации 300

сек и временем диссоциации 1200 сек. Регенерацию поверхности чипа осуществляли двумя короткими инъекциями раствора 10мМ Глицин-HCl pH 1,7. Из данных вычитали значения холостой пробы как для сенсора, не содержащего лиганд, так и для концентрации аналита 0 нМ. Анализ осуществляли с использованием точного соответствия 1:1 и программы BIAcore Insight Evaluation (v2.0) с объемным показателем преломления, установленным на ноль RU. Кажущиеся константы диссоциации (KD) показаны в Таблице 6, а сравнительная сенсограмма связывания при 100 нМ показана на Фиг. 7.

Таблица 6

Иммобилизованный лиганд	Раствор аналита 1, вводимые переменные	Связывание 1:1 ka (1/Me)	kd (1/c)	Кажущаяся KD (M)	Rmax (RU)
фибриллярный Аβ 7,5мкг/мл Ace4.5	Adu	2,96e+7	1,70e-2	5,74e-10	45,2
фибриллярный Аβ 7,5мкг/мл Ace4.5	h2726	3,93e+5	2,12e-5	5,40e-11	51,0
фибриллярный Аβ 7,5мкг/мл Ace4.5	h2731	3,72e+5	2,62e-5	7,04e-11	50,7
фибриллярный Аβ 7,5мкг/мл Ace4.5	h2831	2,65e+5	2,94e-5	1,11e-10	50,2
фибриллярный Аβ 7,5мкг/мл Ace4.5	h2931	3,35e+5	2,05e-5	6,12e-11	50,0

Абета - бета-амилоид, Аβ; ka - константа скорости ассоциации; kd - константа скорости диссоциации; KD - кажущаяся константа равновесия диссоциации; mAb - моноклональное антитело; R_{max} - максимальный ответ; SPR - поверхностный плазмонный резонанс

[00254] Повышенная относительная avidность моноклональных антител по настоящему изобретению в отношении фибриллярного Аβ, наблюдаемая в анализе ELISA, была подтверждена кинетикой равновесного связывания, как было определено методом SPR (Таблица 6), которая указывала на avidность (кажущаяся KD) в 5-11 раз больше, чем у адуканумаба.

[00255] Это объясняется различными кинетическими профилями связывания, наблюдаемыми на сенсограмме SPR (Фиг. 7). Хотя адуканумаб связывает Аβ фибриллы с более высокой скоростью ассоциации (ka), гораздо более медленная скорость диссоциации (kd) моноклональных антител по настоящему изобретению приводила к

большей измеренной avidности (т.е. более низкой KD*), чем у адуканумаба.

[00256] Пример 7. Связывание A β фибрилл, определенное методом ELISA

[00257] Прямое связывание некоторых моноклональных антител по изобретению и адуканумаба с фибриллами A β ₁₋₄₂ и A β _{PE3-42} оценивали методом ELISA. Для получения фибрилл полипептиды A β ₁₋₄₂ или A β _{PE3-42}, предварительно обработанные HFIP (гексафторизопропанолом) и высушенные, ресуспендировали в DMSO до 5 мМ, затем далее разбавляли до 100 мкМ раствором 10 мМ HCl. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24ч, а затем центрифугировали для разделения растворимых и фибриллярных видов. Клеточный осадок ресуспендировали в 1x D-PBS до исходного объема и обрабатывали ультразвуком перед использованием.

[00258] Планшеты покрывали 1,0 мкг/мл или 2,5 мкг/мл фибрилл A β в PBS в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты блокировали 1% BSA/PBS в течение 1 часа. Антитела серийно разводили от 10 мкг/мл до 4,8 нг/мл в 0,1% BSA-PBS и 0,1% Tween 20 и 100 мкл каждого разведения добавляли в двух повторах к каждому антителу и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали четыре раза TBS/Tween 20 и в каждую лунку добавляли 100 мкл козьего анти-человеческого IgG HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA или Invitrogen, Carlsbad, CA) при разведении 1/5000 и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали шесть раз в TBS/Tween 20 и подготавливали таблетки о-фенилендиамин дигидрохлорида (OPD) Thermo Fisher и субстратный буфер ThermoFisher в соответствии с инструкциями изготовителя. Добавляли 100 мкл субстрата и инкубировали 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл H₂SO₄. Планшеты считывали при 490 нм на молекулярных устройствах spectromax. Фиг. 9А и Фиг. 21. На Фиг. 21 кривые и полученные значения EC₅₀ представляют собой нелинейную трехпараметрическую подгонку данных методом наименьших квадратов (данные показаны в Таблице 7).

Таблица 7

mAb	h2726	h2731	h2831	h2931	Adu
EC ₅₀ (мкг/мл mAb)	0,0359	0,03671	0,04894	0,04495	0,7241

[00259] Планшеты покрывали разведениями A β фибрилл в PBS от 10 мкг/мл до 4,8 нг/мл в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты блокировали 1% BSA/PBS в течение 1 часа. В соответствующие лунки добавляли антитела при 2 мкг/мл в 0,1%BSA/PBS 0,1% Tween 20 в двух повторах и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 4x TBS/Tween 20, а затем в каждую лунку добавляли 100 мкл разведения 1/5000 козьего анти-человеческого IgG HRP, Jackson, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали шесть раз в TBS/Tween 20 и подготавливали таблетки о-фенилендиамин дигидрохлорида (OPD) Thermo Fisher и субстратный буфер ThermoFisher в соответствии с инструкциями изготовителя. Добавляли 100 мкл субстрата и инкубировали 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл H₂SO₄. Планшеты считывали при 490 нм на

молекулярных устройствах spectromax. Фиг. 9В, правый график.

[00260] Все антитела h2726, h2731, h2831 и h2931 продемонстрировали сильную аффинность к фибриллам, с разницей между показавшими наилучший и наихудший результат в пределах 25%. Кроме того, эти четыре антитела все продемонстрировали значительно более высокую avidность, чем адуканумаб. На Фиг. 21 3-кратное увеличение сигнала анализируемого образца (OD490) и уменьшенное в 15-20 раз установленное значение EC₅₀ указывают на повышенное общее связывание и относительную avidность mAb h2726, h2731, h2831 и h2931 к фибриллярному Aβ по сравнению с адуканумабом.

[00261] Пример 8. Связывание h2931 с олигомером Aβ, определенное методом ELISA

[00262] Прямое связывание h2931 с олигомером Aβ оценивали методом ELISA. Для получения олигомеров сначала лиофилизированный, биотинилированный и немеченый Aβ (Bachem) каждый солюбилизовали при 1 мг/мл в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (HFIP, Sigma). HFIP давали испариться из образцов в течение ночи в вытяжном шкафу при комнатной температуре. Затем аликвоты центрифугировали в speedvac при комнатной температуре для удаления всей жидкости и получения 250 мкг аликвот пленок HFIP, которые хранили при -80°C до дальнейшего использования.

[00263] Олигомеры получали солюбилизованием 250 мкг биотинилированных и немеченых гранул Aβ HFIP в безводном DMSO (Sigma) до конечной концентрации 5 мМ. Для немеченый:биотинилированный смесей образцы объединяли в соотношении 9:1 (немеченый:биотинилированный) в стерильной 1,5-мл микроцентрифужной пробирке с низким связыванием (Axugen). DMSO-солюбилизованные образцы затем разбавляли до 100 мкМ холодной нейробазальной средой, не содержащей фенола (Invitrogen), и инкубировали в течение 24 часов при 4°C. После инкубации олигомеры отделяли от крупного нерастворимого материала центрифугированием при 14000 g в течение 15 минут. Верхние 90% супернатанта осторожно удаляли и помещали в новую стерильную микроцентрифужную пробирку с низким связыванием и хранили на льду до использования.

[00264] 2,5 мкг/мл каждого препарата в PBS использовали для покрытия лунок в планшетах с высоким связыванием (Costar) для ELISA, 100 мкл на лунку, в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты аспирировали и затем в каждую лунку добавляли 200 мкл 1% BSA в PBS и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Раствор h2931 mAb получали при исходной концентрации 10 мкг/мл в буфере 0,1% BSA/PBS 0,1% tween 20 и осуществляли серийные разведения семь раз (каждый раз 1:2) с использованием этого же буфера. Образцы инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты 4 раза промывали TBS.0,1% tween 20. Козье анти-человеческое (H+L) HRP (Jackson Immunoresearch, PA) разводили 1/5000 в 0,1% BSA/PBS 0,1% tween 20, добавляли при 100 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 4 раза и подготавливали таблетки о-фенилендиамин дигидрохлорида (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями изготовителя. Добавляли

по 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Реакции останавливали добавлением 50 мкл H₂SO₄ и образцы считывали при 490 нм на молекулярных устройствах SpectroMax. Кривые и полученные значения EC₅₀ представляют собой нелинейную трехпараметрическую подгонку данных методом наименьших квадратов с использованием программы GraphPad Prism.

[00265] Было показано, что mAb h2931 связывает растворимые олигомеры с высокой относительной аффинностью, с установленным значением EC₅₀ 23 нг/мл или 0,15 нМ. Фиг. 8.

[00266] **Пример 9. Связывание анти-Аβ антител в головном мозге субъекта с AD**

Образцы ткани. Образцы замороженного мозга человека с AD были получены от Banner Sun Health Research Institute, Sun City, AZ. Ткани получены от доноров, у которых был подтвержден высокий уровень Аβ патологии, и стадия была определена в соответствии с системой Браака в учреждении-поставщике (Таблица 8). Кроме того, контроль качества осуществляли на месте на всех блоках ткани для определения степени их патологии и распределения.

Таблица 8

Информация о донорах с AD

Случай ID	Пол	Летальный исход_возраст	PMI	Оценка по Брааку
AD 13-75	М	77	3,62	VI
AD 14-11	М	82	3,98	V
AD 15-19	Ж	83	3,62	V
AD 11-97	Ж	86	2,52	V

[00268] **Секционирование и фиксация тканей.** Нефиксированные образцы замороженной ткани головного мозга погружали в заливочную среду Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) в криоформах, погруженных в смесь 2-метилбутана и взвеси сухого льда (-60°C), и затем хранили при -80°C до изготовления срезов. Серийные криосрезы толщиной 10 мкм получали с использованием криостата Leica 3050S. Оттаивающиеся срезы сразу помещали на положительно заряженные предметные стекла и хранили при температуре -20°C до использования. Перед осуществлением процедур иммуногистохимического (ИНС) исследования предметные стекла погружали в 10% нейтральный забуференный раствор формалина на 10 минут при 4°C, промывали в PBS, затем инкубировали в течение часа при 37°C в растворе глюкозооксидазы (20 mM бета-D(+) глюкозы, 2 mM азида натрия и 2 единицы/мл глюкозооксидазы в 1X PBS). Предметные стекла промывали 3 раза в течение 5 минут в PBS, прежде чем их переносили на штативы для обработки в автоматическом устройстве для окрашивания препаратов.

[00269] **Биотинилирование антител.** Гуманизированные IgG-антитела

биотинилировали с использованием нековалентного метода путем инкубации с биотин-конъюгированным козым анти-человеческим одновалентным Fab-фрагментом (Jackson ImmunoResearch) в соотношении 1:4 в течение 1 часа при комнатной температуре. Несвязанный избыток Fab абсорбировали путем предварительной инкубации с сывороткой человека еще в течение часа перед использованием. Затем свежеприготовленные антитела загружали в приспособление для окрашивания препаратов для немедленного нанесения на срезы тканей.

[00270] **Иммуноокрашивание.** Окрашивание осуществляли в автоматическом устройстве для окрашивания препаратов Leica Bond Rx Stainer (Leica Biosystems) с использованием набора Bond Research Kit (DS980, Leica Biosystems) и иммунопероксидазной системы детекции, усиленной авидин-биотином. Каждое биотинилированное анти-A β антитело или контрольный IgG человека наносили на срезы в определенных концентрациях на один час и визуализацию окрашивания осуществляли с использованием усиленной системы авидин-биотин (ABC Elite Standard, PK-6100; Vector Laboratories). Затем на срезы наносили гематоксилин для контрастного окрашивания ядер перед обезвоживанием в серии спиртов восходящей концентрации, просветлением в ксилоле, покрытием покровным стеклом и сушкой на воздухе.

[00271] **Визуализация тканей.** Были получены цифровые изображения окрашенных слайдов с использованием сканера слайдов Hamamatsu NanoZoomer 2.0HT (Hamamatsu Corporation), и изображения были захвачены в формате файла.ndpi с использованием программного обеспечения NanoZoomer Digital Pathology (NDP.scan, версия 2.7.25). Изображения, включенные в этот отчет, были захвачены непосредственно из NDP.view и переданы без каких-либо усилений. Для морфометрии оцифрованные слайды анализировали с использованием программного обеспечения Halo (V2.1.1537) для измерения процента окрашенной ткани, а результаты наносили на график с использованием программы GraphPad Prism 8.

[00272] **Результаты, полученные с h2726, h2731, h2831, h2931 и адуканумабом.** Четыре гуманизированных анти-A β антитела по изобретению, h2726, h2731, h2831 и h2931, а также адуканумаб, наносили на все образцы головного мозга от четырех субъектов с AD при увеличивающихся концентрациях: 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 и 9 мкг/мл. Как показано на Фиг. 10 (0,3 мкг/мл), срезы головного мозга субъектов с AD, которые инкубировали с этими антителами, продемонстрировали иммуноположительные структуры, которые типичны для A β -патологии при AD. Образцы головного мозга AD 13-75 и AD 14-11 имели высокую плотность A β бляшек, тогда как патология в образцах головного мозга AD 11-97 и AD 15-19 была сравнительно разреженной. В каждом головном мозге окрашивание, производимое четырьмя антителами h2726, h2731, h2831 и h2931 при определенной концентрации, было сопоставимым по интенсивности и распределению. Окрашивание адуканумабом было самым слабым среди образцов и концентраций. Как проиллюстрировано на Фиг. 11, срезы из всех четырех образцов головного мозга, которые инкубировали с контрольным изотипом IgG человека при 1 или

9 мкг/мл, не имели никакого окрашивания патологии.

[00273] Графики на Фиг. 12 и Фиг. 22 представляют количественную оценку окрашивания пятью антителами во всех четырех образцах головного мозга с AD. Измерения процента площади поверхности ткани с окрашенной патологией подтверждают, что, в каждом головном мозге с AD четыре антитела, h2726, h2731, h2831, h2931, имели аналогичные уровни связывания при всех испытанных концентрациях. Соответственно, данные в Таблице 9 показывают, что для каждого головного мозга значения площади под кривой и EC50, полученные с этими четырьмя антителами, остаются сопоставимыми. Значения, полученные с использованием адуканумаба, были неизменно более низкими в образцах головного мозга с AD во всем диапазоне испытанных концентраций.

[00274] Фиг. 22 показывает большее связывание в области бляшек (процент положительно окрашенной ткани) по сравнению с адуканумабом, особенно при концентрациях антител, которые оцениваются как клинически значимые экспозиции в спинномозговой жидкости, с концентрацией адуканумаба 10 мг/кг. Аналогичное окрашивание в области бляшек наблюдалось при самой высокой испытанной концентрации, что свидетельствует о насыщении связывания на этом уровне.

Таблица 9

Площадь под кривой и полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀)

Площадь под кривой	h2726	h2731	h2831	h2931
AD 11-97	50,18	50,58	49,21	47,70
AD 15-19	52,08	52,71	49,73	44,81
AD 13-75	149,3	150,4	138,7	139,1
AD 14-11	149,1	149,2	148,9	134,5
EC50				
AD 11-97	0,09163	0,1346	0,1019	0,08893
AD 15-19	0,1356	0,1274	0,1328	0,1330
AD 13-75	0,1615	0,1415	0,2144	0,2273
AD 14-11	0,1325	0,1102	0,1625	0,1691

[00275] Результаты с бапинеизумабом (hBP)

[00276] Срезы из головного мозга AD 13-75 инкубировали с гуманизированным антителом hBP, а также с адуканумабом и BAN2401 при увеличивающихся концентрациях: 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 и 9 мкг/мл. Как можно видеть с антителами h2726, h2731, h2831 и h2931, уровень окрашивания с hBP увеличивался дозозависимым образом. Кроме того, hBP окрашивание было сильнее, чем при использовании адуканумаба и BAN2401 при всех испытанных концентрациях, как показано на Фиг. 13.

[00277] Пример 10. Анализы фагоцитоза ex vivo для определения клиренса бляшек (A β ₁₋₄₂ и A β _{ре3-42})

[00278] На ранних стадиях AD функция микроглии носит нейротекторный характер, действие которой направлено на очищение от апоптотических клеток и патологических белковых агрегатов, а также образование барьера вокруг бляшек для ограничения их роста и диффузии синаптотоксических олигомеров A β . Анализы фагоцитоза ex vivo количественно оценивают антитело-опосредованный ответ микроглиального клиренса.

[00279] **Получение первичной микроглиальной культуры:** Для диссекции ткани головного мозга новорожденных мышей детенышей P1 быстро обезглавливали стерильными ножницами. Мозговые оболочки удаляли и передний мозг немедленно погружали в 1-5 мл диссекционной среды (например, DMEM с высоким содержанием глюкозы с 20% FBS, P/S) на льду до тех пор, пока не осуществили диссекцию головного мозга у нужного количества животных. Желательно ограничить общее время процедуры до 10 минут, чтобы свести к минимуму повреждение клеток.

[00280] Ткани тщательно аспирировали два раза подряд новыми стерильными пипетками с использованием иглы 22G, а затем иглы 25G. Образец центрифугировали при 2500 × g в течение пяти минут при 4°C. Супернатант осторожно аспирировали и к клеточному осадку добавляли 5 мл свежей питательной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, P/S и 25 нг/мл рекомбинантного мышинового GM-CSF). Клеточный осадок пипетировали вверх и вниз приблизительно 10 раз стерильной 10-мл пипеткой для диссоциации осадка.

[00281] Клеточное сито (поры 100 мкм) помещали на свежую 50-мл коническую пробирку и материал распределяли через клеточное сито в коническую пробирку. Клеточное сито промывали 4-5 мл свежей среды, затем осуществляли центрифугирование при 200 × g в течение пяти минут при 4°C

[00282] Клетки высевали при плотности головной мозг от двух мышей на T-75 пластиковую колбу для культивирования. Осторожно аспирировали супернатант и к каждому клеточному осадку добавляли 3 мл свежей питательной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, P/S и 25 нг/мл рекомбинантного мышинового GM-CSF) с использованием 10-мл стерильной пипетки. Для ресуспендирования осуществляли пипетирование вверх и вниз 10 раз 10-мл пипеткой. Подготовку 1 стерильной колбы T-75 осуществляли путем добавления 6 мл питательной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, P/S и 25 нг/мл рекомбинантного мышинового гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора) в каждую колбу с последующим добавлением 6 мл ресуспендированных клеточных осадков до конечного объема 12 мл в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C.

[00283] Колбы инкубировали в покое в течение пяти дней, чтобы позволить клеткам прикрепиться. На пятый день культуральную среду заменяли в каждой колбе на 12 мл свежей питательной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, P/S

и 25 нг/мл рекомбинантного мышиноного GM-CSF). Приблизительно 10% смешанных клеток будут прикрепляться и расти на пластиковой поверхности. Замену среды осуществляли два раза в неделю (каждые 3-4 дня) для достижения конfluence. Такие замены осуществляли очень осторожно, не касаясь дна колбы, где прикрепилась клетки.

[00284] Через 7-11 дней колбы вращали со скоростью 200 об/мин с использованием орбитального шейкера Lab-Line с орбитой 19 мм в течение 2 ч при 37°C. Клеточные суспензии центрифугировали при 200 × g и ресуспендировали в среде для анализа (не содержащая гибридом бессывороточная среда H-SFM [Life Technologies] плюс 1% FBS, глутамин, P/S и 5 нг/мл рекомбинантного мышиноного GM-CSF).

[00285] **Анализ ex vivo.** Криостатные срезы (толщиной 10 мкм; использовали широкие лезвия) головного мозга мышей APP/PS1 или человека с AD (менее 3 ч после смерти) 'помещали оттаивающимися' на покрытые полилизинем круглые покровные стекла и помещали в лунки 24-луночных планшетов для тканевых культур (СТ -30С ОТ -20С). Образцы тканей можно нагревать большим пальцем между секциями или снижая ОТ до -12°C). Покровные стекла дважды промывали средой для анализа. Антитела (контрольные или против Аβ) добавляли при 2X концентрации 250 мкл в среду для анализа (конечная концентрация 20 мкг/мл) на 1 ч в инкубаторе для тканевых культур.

[00286] Микроглиальные клетки затем высевали при конечной плотности 800000 клеток/мл (исходный раствор 1600000 клеток/мл) в 250 мкл среды для анализа. Культуры выдерживали во влажном инкубаторе при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 72 часов.

[00287] Оценка общего количества Аβ (Аβ₁₋₄₂). Среду осторожно аспирировали, затем промывали охлажденным льдом PBS. Добавляли 100 мкл 8M мочевины, ткань ресуспендировали путем пипетирования и клетки соскребали кончиком пипетки. Суспензию затем замораживали при -20°C до использования в анализе. Суспензии размораживали на льду, центрифугировали при 16000 × g 20 мин при 4°C перед разведением и анализом с использованием набора V-PLEX Total Аβ₄₂ Peptide (4G8) Kit (Meso Scale Discovery). Результаты показаны на Фиг. 14А, Фиг. 14В и и Фиг. 24. Фиг. 14А и Фиг. 24 представляют уровень Аβ для каждого среза головного мозга, а Фиг. 14В представляет те же данные в виде точечной диаграммы для каждой обработки (данные для Фиг. 14В показаны в Таблице 10; данные для Фиг. 24 показаны в Таблице 11). h2731, h2931 и адуканумаб продемонстрировали высокозначимое уменьшение видов Аβ бляшек по сравнению с изотипическим контролем.

Таблица 10

mAb (ср. пг/мл Аβ ₁₋₄₂)	Изотипический контроль	h2931	Адуканумаб
Среднее значение	92619	53113	49501
SD	14801	18239	7961

Таблица 11

Состояние	Аβ ₁₋₄₂ (пг/мл)	SD
Здоровый контроль	5797,25	2022,51

AD головной мозг+hIgG1 изотип	185138,90	35888,64
AD головной мозг+h2731	101172,05	40194,48

[00288] Количественное определение пироглутамат-3 Аβ (Аβ_{ре3-42}). Усеченный на N-конце и пироглутамат-модифицированный Аβ (например, Аβ_{ре3-42}) был описан как компонент зрелых сенильных бляшек в головном мозге при AD (Saïdo et al., *Neuron* 14, 1995). Было неизвестно, повлияет ли пироглутаматная модификация на N-конце Аβ на связывание с нацеленными на N-конец антителами, такими как h2731 и другие, описанные в настоящей заявке. Точно так же было неизвестно, будут ли эти антитела обладать способностью промотировать фагоцитарно-опосредованный клиренс Аβ_{ре3-42}.

[00289] Присутствие пироглутамат-3 Аβ в головном мозге при AD, используемом в экспериментах *ex vivo*, а также сходный паттерн окрашивания по сравнению с h2931, были подтверждены иммуногистохимическим методом (Фиг. 25А и 25В). Чтобы продемонстрировать удаление пироглутамат-3 Аβ, использовали коммерческий метод ELISA для измерения его удаления во время фагоцитоза *ex vivo*. Суспензии, собранные описанными выше способами, оттаивали на льду, центрифугировали при 16000 × g в течение 20 мин при 4°C перед разбавлением и анализом с использованием коммерческого набора ELISA (Amyloid Beta N3pE Аβ, IBL America). Анализ Аβ_{ре3-42} методом ELISA является высокоспецифическим в отношении Аβ_{ре3-42} по сравнению с немодифицированным Аβ₁₋₄₂ (данные не показаны).

[00290] Результаты показаны на Фиг. 26А и Фиг. 26В (данные показаны в Таблице 12 и Таблице 13, соответственно), которые представляют уровни пироглутамат-3 Аβ в срезах головного мозга после обработки указанными антителами, h2931 на Фиг. 26А и h2731 на Фиг. 26В, каждый из которых сравнивали со здоровым контролем и сравнивали с головным мозгом при AD, обработанным IgG1 изотипическим контролем. Для каждой обработки использовали срезы головного мозга от разных субъектов с AD. h2731 и h2931 оба продемонстрировали высокосignificantное уменьшение пироглутамат-3 Аβ по сравнению с изотипическим контролем.

[00291] Фиг. 24 и Фиг. 26В, взятые вместе, показывают, что анти-Аβ антитела по настоящему изобретению (например, h2731) промотируют клиренс как Аβ₁₋₄₂, так и Аβ_{ре3-42} белка при инкубации на срезах ткани головного мозга пациента с AD с первичной мышью микроглией. Эти результаты подтверждают, что эти антитела устраняют оба Аβ₁₋₄₂ и Аβ_{ре3-42} в условиях патологии человека.

[00292] N-конец-нацеленные анти-Аβ антитела способствовали обильному микроглия-опосредованному клиренсу видов Аβ бляшек, включая пироглутамат-модифицированный Аβ, в ткани головного мозга от пациентов с AD. Эти данные являются обоснованием для дальнейшей разработки антител по настоящему изобретению в качестве подкожно вводимой иммунотерапии антителами для лечения болезни Альцгеймера.

Таблица 12

Состояние	AbpE3-42 (пг/мл)	SD
-----------	------------------	----

Здоровый контроль	44,20	6,39
AD головной мозг+hIgG1 изотип	259,42	27,39
AD головной мозг+h2931	62,59	16,16

Таблица 13

Состояние	AbpE3-42 (пг/мл)	SD
Здоровый контроль	26,75	34,83
AD головной мозг+hIgG1 изотип	478,91	117,80
AD головной мозг+h2731	153,76	67,59

[00293] Пример 11. Блокирование олигомеров в анализе связывания в гиппокампе

[00294] Анализ связывания A β в нейронах гиппокампа крысы

[00295] Первичные нейроны гиппокампа крысы E18 культивировали, как описано Zago et al. (J. Neurosci 22 February 2012, 32 (8) 2696-2702). Растворимый A β преинкубировали с антителом и без антитела на культуре DIV14-21 для блокирования нейритного связывания с первичными нейронами.

[00296] Свежий немеченный, биотинилированный или (9:1) немеченный:биотинилированный растворимый A β получали за один день до осуществления анализа и инкубировали в течение ночи при 4°C. A β центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут перед использованием.

[00297] Было получено каждое разведение раствора A β и антитела при (2x) конечной концентрации для обработки в половине конечного объема обработки с использованием среды NeuroBasal-без фенолового красного (NB-NPR) или NbActiv4-NPR. После объединения смесь смешивали 3-4 раза, затем преинкубировали в течение 30 минут при 37°C.

[00298] непосредственно перед анализом связывания нейроны промывали предварительно нагретым NB-NPR при 150 мкл/лунка. Буфер аспирировали и затем к клеткам добавляли антитело/обработку A β при 60 мкл/лунка, затем инкубировали в течение 30-40 минут при 37°C в нормальных условиях инкубатора (5% CO₂; 9% O₂).

[00299] Нейроны промывали два раза в NB-NPR 150 мкл/лунка, затем фиксировали в 4% параформальдегиде в 1x DPBS в течение 20 минут при комнатной температуре.

[00300] Клетки пермеабелизировали в 0,1% Triton X-100 в 1x DPBS в течение 5 минут и затем блокировали в 10% нормальной козьей сыворотке (NGS) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT).

[00301] Образцы инкубировали с первичными антителами к ассоциированному с микротрубочками белку 2 (MAP2) и нейрональному ядерному белку (NeuN) в 100 мкл/лунка 1x DPBS, содержащем 1% BSA+1% NGS, в течение ночи при 4°C. На следующий день образцы промывали два раза в 1x DPBS (150 мкл/лунка, каждая промывка в течение 5 минут). Вторичное антитело добавляли в течение 1 часа при комнатной температуре в 100 мкл/лунка 1x DPBS+1% BSA+1% NGS.

[00302] Анализ изображений с высоким содержанием (HCI) осуществляли для количественного определения пятен нейритного связывания растворимого A β с

использованием устройства Operetta HCl CLS (Perkin Elmer; модифицированный алгоритм Neurite Outgrowth: объектив 40x H₂O; 25-40 полей на лунку в формате микропланшета; (n=3) на состояние. Нейрональные маркеры MAP2 и NeuN использовали для каждого отслеживания нейритного дерева и подсчета количества клеточных тел на оптическое поле (например, с первичными антителами к ассоциированному с микротрубочками белку 2 (Abcam; Cambridge, UK) и NeuN (EMD Millipore), затем AlexaFluor вторичными детекторными антителами (Thermo Fisher Scientific)). Детекцию нейритных Аβ пятен осуществляли с использованием различных моноклональных и поликлональных антител к Аβ (например, мышинового моноклонального анти-Аβ антитела MabN254 (EMD Millipore)), затем вторичных детекторных антител AlexaFluor (Thermo Fisher Scientific) или стрептавидин-AF488 для биотинилированного Аβ материала. Фиг. 15А и Фиг. 15В показывают, что повышение концентраций анти-Аβ антитела уменьшает количество пятен на нейрон, что указывает на активность против Аβ. Фиг. 23 показывает, что h2731 эффективно блокировал связывание растворимых агрегатов Аβ с синапсами гиппокампа крысы (Аβ42 пятен на нейрон) зависимым от концентрации образом. Эффект h2731 был определен даже при таких низких молярных отношениях mAb: Аβ42, как 1:500 (p < 0,05), и >90% блокада связывания достигалась при 1:50 молярных отношениях (p < 0,001) по сравнению с только Аβ42 (без mAb преинкубации). Данные показаны в Таблице 14.

Таблица 14

	Растворимый Аβ	Изотипический контроль	h2731	h2731	h2731	h2731
	1 мкМ	1:50	1:1000	1:500	1:100	1:50
Среднее значение (Аβ пятен на нейрон)	76,3	58,7	51,0	39,7	11,3	6,3
SD	28,2	12,9	14,9	12,1	4,9	1,5

[00303] **Пример 12. Связывание анти-Аβ антител с нативными и модифицированными видами Аβ**

[00304] Криостатные срезы головного мозга человека с АД помещали оттаивающимися на покрытые поли-D-лизином покровные стекла и помещали в 24-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали с испытываемыми антителами в течение 1 часа при 37°C 5% CO₂. Затем высевали первичные мышинные микроглиальные клетки при 800000 клеток/мл и культуры поддерживали при 37°C 5% CO₂ в течение 72 часов. Среду осторожно аспирировали и срезы промывали PBS. Срезы ресуспендировали в 8М мочевины для количественной оценки методом ELISA для Аβ_{PE3-42} (Immuno-Biological Laboratories, Minneapolis, MN) или методом MSD для Аβ₁₋₄₂ (Meso Scale Diagnostics, Rockland, MD). Набор Immuno-Biological Laboratories для ELISA Аβ_{PE3-42} специфически определяет виды PE3-42, при этом сигнал для полноразмерного Аβ не обнаруживается.

[00305] Фиг. 27 демонстрирует, что h2731 связывается с высокой кажущейся аффинностью с N-концом полноразмерного Аβ, но не непосредственно с пироглутамат-

модифицированным Аβ (Аβ_{РЕ3-42}). h2731 связывался при полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) 8,1 нг/мл (54 пМ) с видами фибриллярного Аβ с немодифицированным N-концом (Аβ₁₋₄₂). h2731 не демонстрировал никакого определяемого связывания с Аβ_{РЕ3-42} вплоть до 100 нг/мл.

[00306] Пример 13. Фагоцитарно-опосредованный клиренс in vitro - Опосредованное человеческими моноцитами ТНР-1 поглощение Аβ₁₋₄₂ протофибрилл

[00307] Синтетические протофибриллы Аβ₁₋₄₂, содержащие S26С мутацию, были получены, как описано в Paranjare et al., ACS Chem. Neurosci. 2012, 3, 302–311. Вкратце, пептиды Аβ растворяли в 100% гексафторизопропаноле (HFIP) (SigmaAldrich, St. Louis, MO) при 1 мМ, распределяли аликвотами в стерильные микроцентрифужные пробирки и упаривали в незакрытых пробирках при комнатной температуре в течение ночи в вытяжном шкафу. На следующий день аликвоты подвергали вакуумному центрифугированию для удаления любого остаточного HFIP и хранили в осушителе при –20°C. Некоторые Аβ-пептиды обрабатывали 100% трифторуксусной кислотой и подвергали вакуумному центрифугированию перед HFIP-обработкой. Аβ олигомеры и фибриллы, полученные непосредственно из лиофилизированных аликвот, получали путем ресуспендирования аликвот лиофилизированных Аβ пептидов в стерильном безводном диметилсульфоксиде (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) при 5 мМ. Для получения олигомеров образец разбавляли до 100 мкМ в стерильной охлажденной льдом, не содержащей фенолового красного клеточной культуральной среде F-12 Хэма с L-глутамином (F-12, Bioworld, Dublin, OH) и инкубировали в течение 24 часов при 4°C. Для получения фибрилл образец разбавляли до 100 мкМ в 10 мМ HCl и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Концентрации Аβ в этих препаратах определены в расчете на сухую массу пептидов.

[00308] Зрелые протофибриллы конъюгировали с красителем pHrodo Red Maleimide (Thermo Fisher) перед использованием в анализах фагоцитарно-опосредованного клиренса in vitro.

[00309] Антитела при концентрациях 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,098, и 0,049 мкг/мл преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с pHrodo-Аβ₁₋₄₂ протофибриллами, затем добавляли фагоцитарные клетки ТНР-1. После 3-час инкубации при 37°C и 5% CO₂ оценивали антитело-опосредованный фагоцитарно-опосредованный клиренс путем измерения клеточного pHrodo сигнала методом проточной цитометрии.

[00310] Как показано на Фиг. 28А и Фиг. 28В, анти-Аβ антитела продемонстрировали фагоцитарную активность в отношении Аβ₁₋₄₂ протофибрилл зависимым от концентрации образом. Эти результаты предполагают, что антитела по настоящему изобретению могут быть способными стимулировать клиренс Аβ₁₋₄₂ в ткани головного мозга.

[00311] Пример 14. Распределение общего и пироглутамат-модифицированного Аβ в ткани головного мозга от пациентов с прогрессирующей

AD

[00312] ИНС методы *ex vivo*, описанные выше и в данном подразделе, осуществляли на ткани головного мозга субъектов с AD для определения распределения $A\beta_{1-xx}$ (определяли с антителом, нацеленным на N-конец $A\beta$) и анти- $A\beta_{pE3-42}$.

[00313] Оценка $A\beta_{1-xx}$ и $A\beta_{pE3-42}$ подтвердила широкое распространение обоих видов в тканях пациентов с поздней стадией AD. Паттерн распределения (Фиг. 29А(1) и Фиг. 29А(2) (и увеличенные Фиг. 29В(1) и Фиг. 29В(2), соответственно)) и количественная оценка (Фиг. 29С) процента площади, покрытой $A\beta_{1-xx}$, по сравнению с $A\beta_{pE3-42}$ согласовывались с предыдущими исследованиями, предполагая, что $A\beta_{pE3-42}$ представляет собой относительно меньший пул модифицированного $A\beta$, смешанного с немодифицированным $A\beta$, на который нацелены связывающиеся с N-концом $A\beta$ антитела. $A\beta_{pE3-42}$ показан на Фиг. 29А(2) и Фиг. 29В(2), а $A\beta$ с интактным N-концом показан на Фиг. 29А(1) и Фиг. 29В(1). Анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитело не было перекрестно-реактивным с $A\beta_{1-42}$ (данные не показаны).

[00314] В рамке на Фиг. 29А(1) и Фиг. 29В(1) показана $A\beta$ бляшка с интактным по N-концу $A\beta$ и модифицированным $A\beta_{pE3-42}$ проксимально к кровеносному сосуду. В Таблице 15 ниже представлена количественная оценка окрашивания в бляшках на Фиг. 29В(1) и Фиг. 29В(2), которая представлена в виде графика на Фиг. 29С. Разница между средними значениями статистически значима ($p=0,007$, парный двусторонний t-критерий).

Таблица 15

Антитело	% окрашенной площади (среднее значение \pm SD; N=5)
антитело к N-концу $A\beta$	12,59 \pm 4
анти- $A\beta_{pE3-42}$ $A\beta$ антитело	7,17 \pm 1,8

[00315] **Пример 15. Анти- $A\beta$ антитело h2731 колокализуется с $A\beta_{pE3-42}$ в головном мозге от субъекта с AD**

[00316] Колокализацию h2731-иммуноокрашивания и $A\beta_{pE3-42}$ оценивали методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Антитело, нацеленное на N-конец $A\beta$ (в этом случае h2731), предварительно конъюгировали с Су3-вторичным анти-человеческим антителом (Jackson Laboratories) перед нанесением на ткани. Детекцию $A\beta_{pE3-42}$ осуществляли с использованием мышинового анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитела с 488-AlexaFluor-конъюгированным анти-мышинным вторичным антителом. Предметные стекла визуализировали с использованием микроскопа IX81 Olympus с программой Metamorph, соединенного с камерой Hamamatsu (C10600-10B).

[00317] Фиг. 30 (панель А) представляет локализацию h2731 в области $A\beta$ бляшек; Фиг. 30 (панель В) представляет локализацию сигнала анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитела в области $A\beta$ бляшек; и Фиг. 30 (панель С) представляет колокализацию h2731 и сигнала анти- $A\beta_{pE3-42}$ антитела в области $A\beta$ бляшек. Перекрывающийся сигнал более заметен в плотных сердцевинных областях бляшек.

[00318] **Пример 16. Анти- $A\beta$ -антитела по настоящему изобретению способствуют клиренсу $A\beta_{pE3-42}$ из ткани головного мозга субъектов с AD *ex vivo***

дозозависимым образом с более высокой эффективностью, чем адуканумаб.

[00319] Используя способы, описанные выше и в других местах в настоящей заявке, оценивали способность адуканумаба и антител по настоящему изобретению (например, h2731) к устранению белка $A\beta_{pE3-42}$ из ткани головного мозга субъектов с AD.

[00320] Физиологически релевантную серию доза-ответ h2731 (3 нг/мл, 10 нг/мл, 30 нг/мл и 100 нг/мл) инкубировали со срезами ткани головного мозга пациентов с AD и первичной мышинной микроглией в течение 72 часов. h2731 способствовал клиренсу $A\beta_{pE3-42}$ зависимым от концентрации образом. Результаты представлены в Таблице 16 ниже и на Фиг. 31А.

Таблица 16

Антитело	Концентрация (нг/мл)	Средн. $A\beta_{pE3-42}$ (пг/мл) (n=4)	SD
hIgG1 изотип	100	524,34	83,36
h2731	3	479,56	129,92
h2731	10	339,06	165,44
h2731	30	229,28	51,16
h2731	100	261,15	60,81

[00321] h2731 сильно активирует клиренс $A\beta_{pE3-42}$ из срезов ткани головного мозга от пациента с AD путем микроглиального фагоцитоза зависимым от концентрации образом и в течение относительно короткого периода инкубации (72 часов). Таким образом, антитела по настоящему изобретению промотируют *ex vivo* клиренс $A\beta_{pE3-42}$ из головного мозга пациента с AD при концентрации в пределах, которые, как ожидают, должны достигаться при подкожном введении.

[00322] Осуществляли еще одну серию экспериментов, сравнивая h2731 при 25 нг/мл и 75 нг/мл с адуканумабом при 25 нг/мл и 225 нг/мл. Результаты представлены в Таблице 17 и на Фиг. 31В.

Таблица 17

Антитело	Концентрация (нг/мл)	Средн. $A\beta_{pE3-42}$ (пг/мл) (n=4)	SD
hIgG1 изотип	225	449,11	58,14
Adu	225	227,30	98,95
Adu	25	247,34	48,06
h2731	75	52,83	25,40
h2731	25	71,31	64,93

[00323] h2731 продемонстрировал более высокую активность, способствующую клиренсу $A\beta_{pE3-42}$, по сравнению с адуканумабом, даже при концентрациях в 9 раз ниже.

[00324] Другую физиологически значимую серию доза-ответ h2731 и адуканумаба (3 нг/мл, 25 нг/мл и 225 нг/мл) инкубировали со срезами ткани головного мозга пациента с AD и первичной мышинной микроглией в течение 72 часов, при этом оба антитела сравнивали с изотипическим контролем IgG1. В то время как и h2731, и адуканумаб

способствовали клиренсу $A\beta_{pE3-42}$ зависимым от концентрации образом, h2731 снова делал это значительно более эффективно, с p -значением $<0,0001$ при концентрации в 9 раз ниже, чем требуется для адуканумаба для достижения p -значения 0,0005. Результаты представлены в Таблице 18 ниже, а также на Фиг. 32А.

Антитело	Концентрация (нг/мл)	AbpE3-42 (пг/мл)	SD
hIgG1 изотип	225	1,00	6,73
Adu	225	85,97	74,35
Adu	25	146,70	24,30
Adu	3	245,97	41,70
h2731	225	20,60	14,44
h2731	25	41,07	31,15
h2731	3	154,95	35,89

[00325] Чтобы подтвердить, что h2731-опосредованная активность фагоцитоза *ex vivo* зависит от микроглии, был осуществлен эксперимент +/- микроглия. В то время как микроглия сама по себе обеспечивает некоторый клиренс $A\beta_{pE3-42}$ из срезов тканей пациентов с AD, значительно больший клиренс достигался с комбинацией h2731 и микроглии. h2731, по-видимому, требует присутствия микроглии для способствующей клиренсу активности, поскольку h2731, используемый отдельно, не показал никакой активности без микроглии. Результаты представлены в Таблице 19 и на Фиг. 32В.

Антитело	Концентрация (нг/мл)	AbpE3-42 (пг/мл)	SD
hIgG1 изотип	75	271,79	27,01
h2731	75	263,70	51,28
hIgG1+Микроглия	75	174,58	15,75
h2731+Микроглия	75	58,37	15,53

[00326] Испытываемые концентрации антител были основаны на диапазонах в ЦНС, оцененных при 0,1% от стационарных минимальных и максимальных концентраций в плазме из смоделированной фармакокинетики после ежемесячного введения h2731 3 мг/кг подкожно (25-75 нг/мл) или введения адуканумаба 10 мг/кг внутривенно (25-225 нг/мл) у людей (Фиг. 33).

[00327] Антитела по настоящему изобретению способствуют клиренсу *ex vivo* $A\beta_{pE3-42}$ из головного мозга пациента с AD в диапазоне концентраций, который, как ожидается, достигается при подкожном введении, и с большей биологической активностью, чем у адуканумаба.

[00328] Антитело h2731 уменьшает окрашивание $A\beta_{pE3-42}$ в головном мозге субъекта с AD. На Фиг. 34 показано, что $A\beta_{pE3-42}$ (окрашивание показано белыми стрелками) наблюдался в бляшках (белые треугольники) и был ассоциирован с

кровеносными сосудами (круглая форма на Фиг. 34А и Фиг. 34С) в головном мозге от субъекта с AD, обработанном человеческим IgG изотипическим контрольным антителом (Фиг. 34А и Фиг. 34В). Обработка антителом h2731 усиливала микроглия-опосредованное снижение уровней $A\beta_{pE3-42}$, о чем свидетельствует уменьшение бляшек (Фиг. 34С и Фиг. 34D). Антитела по настоящему изобретению, примером которых является h2731, уменьшают количество бляшек, содержащих $A\beta_{pE3-42}$, в ткани.

[00329] Пример 17. Связывание h2731 с мишенью

[00330] Самок мышей APPxPS1, экспрессирующих мутантный человеческий белок-предшественник амилоида (hAPP[V717I]) и мутантный человеческий пресенилин 1 (hPS1[A246E]), использовали для оценки способности h2731 и адуканумаба преодолевать гематоэнцефалический барьер после периферического введения и связываться с бета-амилоидными ($A\beta$) бляшками в головном мозге. Средний возраст животных на начало исследования составил 6,7 мес. За день до введения лекарственного средства всем животным вводили инъекцию анти-CD4-антитела (20 мг/кг, внутривенно) для предотвращения образования антилекарственных антител у мышей, получавших h2731 или адуканумаб, оба из которых являются полностью гуманизированными антителами. h2731 (3 или 10 мг/кг, подкожно, п/к) или адуканумаб (10 мг/кг, внутривенно) вводили еженедельно в течение трех недель, а затем через неделю животных подвергали эвтаназии. После транскардиальной перфузии ледяным солевым раствором у мышей извлекали головной мозг и мгновенно замораживали в 2-метилбутане на сухом льду и хранили при -80°C .

[00331] Серийные сагиттальные криосрезы толщиной 10 мкм получали с использованием криостата Leica 3050S. Срезы непосредственно оттаивали на положительно заряженных предметных стеклах и хранили при температуре -20°C до использования. Перед ИНС предметные стекла погружали в 10% нейтральный забуференный раствор формалина на 10 минут при 4°C , промывали в PBS, затем инкубировали в течение часа при 37°C в растворе глюкозооксидазы (20 мМ бета-D(+) глюкозы, 2 мМ азида натрия и 2 Ед./мл глюкозооксидазы в 1X PBS). Предметные стекла промывали 3 раза в течение 5 минут в PBS, прежде чем их переносили на штативы для окрашивания для обработки в автоматическом красителе. Биотин-SP-конъюгированный козий анти-человеческий IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories #109-065-088) использовали для детекции h2731 или адуканумаба в ткани головного мозга APPxPS1. Окрашивание осуществляли в автоматическом окрашивающем устройстве Leica Bond Rx Stainer (Leica Biosystems) с использованием набора Bond Research Kit (DS980, Leica Biosystems). Затем на срезы наносили гематоксилин для контрастного окрашивания ядер перед обезвоживанием в серии спиртов восходящей концентрации, просветлением в ксилоле, покрытием покровным стеклом и сушкой на воздухе. Полные срезы визуализировали с использованием сканера слайдов NanoZoomer 2.0HT (Hamamatsu Corporation, Japan). Морфометрический анализ оцифрованных изображений осуществляли с использованием программного обеспечения Halo (V2.1.1537). После получения

изображения коры головного мозга как области интереса определяли процент площади окрашенной ткани. Данные представлены в Таблице 20.

Таблица 20

	h2731		Адуканумаб
	3 мг/кг, п/к	10 мг/кг, п/к	10 мг/кг, в/в
Связывание с бляшками (% ROI)	0,070 ± 0,025	0,079 ± 0,034	0,060 ± 0,034

ROI=область анализа. Все данные представляют собой среднее значение ± SD (стандартное отклонение) от n=5 животных на группу

[00332] Уменьшение количества или размера Аβ бляшек при болезни Альцгеймера может коррелировать с замедлением или реверсией прогрессирования заболевания. Способность анти-Аβ-антител по настоящему изобретению к связыванию и клиренсу Аβ *in vivo* после периферического введения подтверждает потенциальную полезность этих антител в качестве терапевтических средств.

[00333] Таким образом, антитела по настоящему изобретению способствуют микроглия-опосредованному клиренсу Аβ₁₋₄₂ в ткани головного мозга от пациентов с АД. Хотя антитела по настоящему изобретению могут не нацеливаться непосредственно на пироглутаматную модификацию, они могут быть эффективны для клиренса Аβ_{РЕ3-42} в концентрациях, которые, по прогнозам, являются клинически значимыми, и с более высокой эффективностью и большей биологической активностью, чем у адуканумаба, как показано на примере h2731. Клиренс пироглутаматных видов этими антителами может быть связан со способностью микроглии распознавать опсонизированные бляшки и поглощать крупные частицы с разнообразным содержанием. Таким образом, антитела по настоящему изобретению могут устранять другие нейротоксичные элементы, совместно отложившиеся в бляшках, по тому же механизму.

[00334] Все публикации (включая номера доступа GenBank, номера доступа UniProtKB/Swiss-Prot и т.п.), цитируемые патенты и патентные заявки полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент и патентная заявка были специально и индивидуально указаны как включенные в качестве ссылки во всей полноте для всех целей. В случае любых расхождений в последовательностях, связанных с номерами доступа Genbank и UniProtKB/Swiss-Prot и т.п., заявка ссылается на последовательности, связанные с указанными номерами доступа на дату подачи заявки, что означает фактическую дату подачи или более раннюю дату предварительной заявки, раскрывающей соответствующий номер доступа. Любой признак, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект раскрытия может использоваться в комбинации с любым другим, если специально не указано иное. Хотя настоящее раскрытие было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, будет очевидно, что возможны определенные изменения и модификации в

пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с пептидом Аβ, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи являются такими, как показано для одного из антител в Таблице 1А и Таблице 1В.

2. Антитело или его фрагмент по п. 1, где вариабельная область тяжелой цепи является такой, как показано для одного из антител в Таблице 1А и Таблице 1В.

3. Антитело или его фрагмент по п. 1, где вариабельная область легкой цепи является такой, как показано для одного из антител в Таблице 1А и Таблице 1В.

4. Антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с пептидом Аβ, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где

CDR1 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 16, 19 или 20,

CDR2 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23,

CDR3 тяжелой цепи включает одну из SEQ ID NO: 18, 24 или 25,

CDR1 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 26, 29, 31 или 32,

CDR2 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36, и

CDR3 легкой цепи включает одну из SEQ ID NO: 28, 38 или 39.

5. Антитело или его фрагмент по п. 1 или п. 4, где вариабельная область тяжелой цепи, исключая CDR-области, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 и 7, и вариабельная область легкой цепи, исключая CDR-области, по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

6. Антитело или его фрагмент по п. 5, где вариабельная область тяжелой цепи, исключая CDR-области, по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, и 7, и вариабельная область легкой цепи, исключая CDR-области, по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

7. Антитело или его фрагмент по п. 6, где вариабельная область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 и 7, и вариабельная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

8. Антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с пептидом Аβ, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность

GFTFSNX₁GMS, где X₁ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 88);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGSGRTTYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V (SEQ ID NO: 89);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDNHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность KSSQSLLDYDGKTYLN (SEQ ID NO: 91);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRDX₃, где X₁=K или R, X₂ представляет собой S или T и X₃ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 92).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGTHFPRX₁, где X₁ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 93).

9. Антитело или его фрагмент по п. 8, где CDR3 легкой цепи включает WQGTHFPRX₁FX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 94).

10. Антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с пептидом Aβ, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

CDR1 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность GFTFX₁NX₂GMS, где X₁ представляет собой S или A и X₂ представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 95);

CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SX₁RSGX₂X₃RTYYSDNVKG, где X₁ представляет собой I или V, X₂ представляет собой S или G и X₃ представляет собой S или G (SEQ ID NO: 96);

CDR3 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность YDNHYX₁GX₂SDY, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 90);

CDR1 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁SSQSLX₂DX₃DGKTYLN, где X₁ представляет собой K или R, X₂ представляет собой V, M или L и X₃ представляет собой Y, T или S (SEQ ID NO: 97);

CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность X₁VX₂NRX₃X₄, где X₁=K или R, X₂ представляет собой S или T, и X₃ представляет собой E или D, и X₄ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 98).

CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность WQGX₁HFPRX₂, где X₁ представляет собой S или T и X₂ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 99).

11. Антитело или его фрагмент по п. 10, где CDR3 легкой цепи включает WQGTHFPRX₁FX₂X₃, где X₁ представляет собой S или T, X₂ представляет собой S или T и

X₃ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 100).

12. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, где антитело является гуманизированным.

13. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11 где антитело представляет собой человеческий IgG1.

14. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, где антитело представляет собой полное антитело, химерное антитело, CDR-привитое антитело или рекомбинантное антитело.

15. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, где фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc или Fv.

16. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, также содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:40.

17. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, также содержащее константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:41.

18. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-17, где антитело специфически связывается с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, содержащую три или более аминокислотных положений из аминокислот 1-7 Aβ.

19. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-19 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

21. Способ получения антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18, содержащий:

(а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела или его фрагмента, таким образом, клетки секретируют антитело или его фрагмент; и

(б) очистку антитела или его фрагмента из клеточной культуры.

22. Способ получения клеточной линии, продуцирующей антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-18, содержащий:

(а) введение вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела или его фрагмента, и селективируемого маркера в клетки;

(б) размножение клеток в условиях для отбора клеток, имеющих повышенное число копий вектора;

(с) выделение отдельных клеток из отобранных клеток; и

(д) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основании выхода антитела или его фрагмента.

23. Способ по п. 22, дополнительно содержащий размножение клеток в селективных условиях и скрининг для идентификации клеточных линий, естественным

образом экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

24. Способ профилактики или лечения амилоидогенетического заболевания у пациента, содержащий введение пациенту эффективной дозы антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

25. Способ по п. 24, где амилоидогенетическое заболевание представляет собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

26. Способ лечения пациента, у которого диагностирована болезнь Альцгеймера, содержащий введение пациенту, имеющему такое заболевание, антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 по схеме, эффективной для лечения заболевания.

27. Способ снижения риска или задержки начала болезни Альцгеймера у пациента, у которого риск заболевания был определен на основании генетического или биохимического маркера, содержащий введение пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 по схеме, эффективной для снижения риска или задержки начала болезни.

28. Способ улучшения когнитивных способностей у субъекта, имеющего связанное с амилоидогенетическим заболеванием состояние или заболевание, содержащий введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18.

29. Способ по п. 28, где амилоидогенетическое заболевание представляет собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

30. Способ лечения синдрома Дауна или клинической или доклинической болезни Альцгеймера у субъекта-человека, содержащий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

31. Способ ингибирования образования амилоидных бляшек у субъекта-человека, содержащий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

32. Способ уменьшения амилоидных бляшек в головном мозге у субъекта-человека, содержащий введение субъекту-человеку эффективного количества гуманизованного антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

33. Способ ингибирования или уменьшения амилоидных бляшек у субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-18 с использованием эффективной схемы введения, ингибируя или уменьшая таким образом амилоидные бляшки у субъекта.

34. Способ по любому из пп. 31-33, где амилоидная бляшка включает A β ₁₋₄₂, пироглутаматный тип A β (например, A β _{PE3-42}) или их комбинацию.

35. Способ выявления амилоидных бляшек у субъекта, имеющего

амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 и детекцию антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта.

36. Способ по п. 35, где амилоидогенетическое заболевание представляет собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронто-tempоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

37. Способ по п. 35, где антитело или его фрагмент является меченым.

38. Способ по п. 35, где антитело или его фрагмент является меченым флуоресцентной меткой, парамагнитной меткой или радиоактивной меткой.

39. Способ по п. 38, где радиоактивную метку обнаруживают с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT).

40. Способ определения эффективности лечения у субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания, содержащий:

(a) измерение первого уровня амилоидных бляшек у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 и определение первого количества антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта,

(b) введение лечения субъекту,

(c) измерение второго уровня амилоидных бляшек у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента и определение антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта,

где снижение уровня амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение.

41. Способ определения эффективности лечения у субъекта, которого лечат от амилоидогенетического заболевания, содержащий:

(a) измерение первого уровня амилоидных бляшек у субъекта до лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-18 и определение первого количества антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта,

(b) введение лечения субъекту,

(c) измерение второго уровня амилоидных бляшек у субъекта после лечения путем введения субъекту антитела или его фрагмента и определение второго количества антитела или его фрагмента, связанного с А β , у субъекта,

где отсутствие изменения уровня амилоидных бляшек или небольшое повышение уровня амилоидных бляшек указывает на положительный ответ на лечение.

42. Способ промотирования клиренса А β у субъекта-человека, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

43. Способ по п. 42, где А β присутствует в ткани головного мозга субъекта.

44. Способ устранения А β у субъекта-человека, содержащий введение субъекту,

используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

45. Способ по п. 44, где Аβ присутствует в ткани головного мозга субъекта.

46. Способ уменьшения Аβ у субъекта-человека, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

47. Способ по п. 46, где Аβ присутствует в ткани головного мозга субъекта.

48. Способ уменьшения аккумуляции или агрегации Аβ у субъекта-человека, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

49. Способ по п. 48, где Аβ присутствует в ткани головного мозга субъекта.

50. Способ ингибирования аккумуляции или агрегации Аβ у субъекта-человека, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18.

51. Способ по п. 50, где Аβ присутствует в ткани головного мозга субъекта.

52. Способ промотирования клиренса Аβ в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18, промотируя таким образом клиренс Аβ в ткани головного мозга у субъекта.

53. Способ устранения Аβ в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18, устраняя таким образом Аβ в ткани головного мозга у субъекта.

54. Способ уменьшения Аβ в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18, уменьшая таким образом Аβ в ткани головного мозга у субъекта.

55. Способ уменьшения аккумуляции или агрегации Аβ в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18, уменьшая таким образом аккумуляцию или агрегацию Аβ в ткани головного мозга у субъекта.

56. Способ ингибирования аккумуляции или агрегации Аβ в ткани головного мозга субъекта, имеющего амилоидогенетическое заболевание или имеющего риск его развития, содержащий введение субъекту, используя эффективную схему введения, антитела или фрагмента по любому из пп. 1-18, ингибируя таким образом аккумуляцию или агрегацию Аβ в ткани головного мозга у субъекта.

57. Способ по любому из пп. 52-56, где амилоидогенетическое заболевание представляет собой системный амилоидоз, болезнь Альцгеймера, диабет зрелого возраста, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, фронтотемпоральную деменцию, синдром Дауна или легкие когнитивные нарушения.

58. Способ по любому из пп. 42-57, где $A\beta$ включает $A\beta_{1-42}$, пироглутаматный тип $A\beta$ (например, $A\beta_{\text{рез-42}}$) или их комбинацию.

59. Способ по любому из пп. 24-58, где антитело или фрагмент вводят путем периферического введения.

60. Способ по п. 59, где периферическое введение является внутривенным или подкожным.

По доверенности

ФИГ.1

	10	20	30	40	50	60																																																							
hBP VL	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	60
IGKV2-30*02	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	D	G	N	T	Y	L	N	W	F	Q	R	P	G	Q	S	P	R	R	L	I	Y	K	V	S	N	R	D	60	
hBP_VK_hu1 VL	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	E	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	K	V	S	N	R	D	60
hBP_VK_hu2 VL	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	S	D	G	R	T	Y	L	N	W	L	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	K	V	S	N	R	D	60
hBP_VK_hu3 VL	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	E	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	K	V	S	N	R	D	60

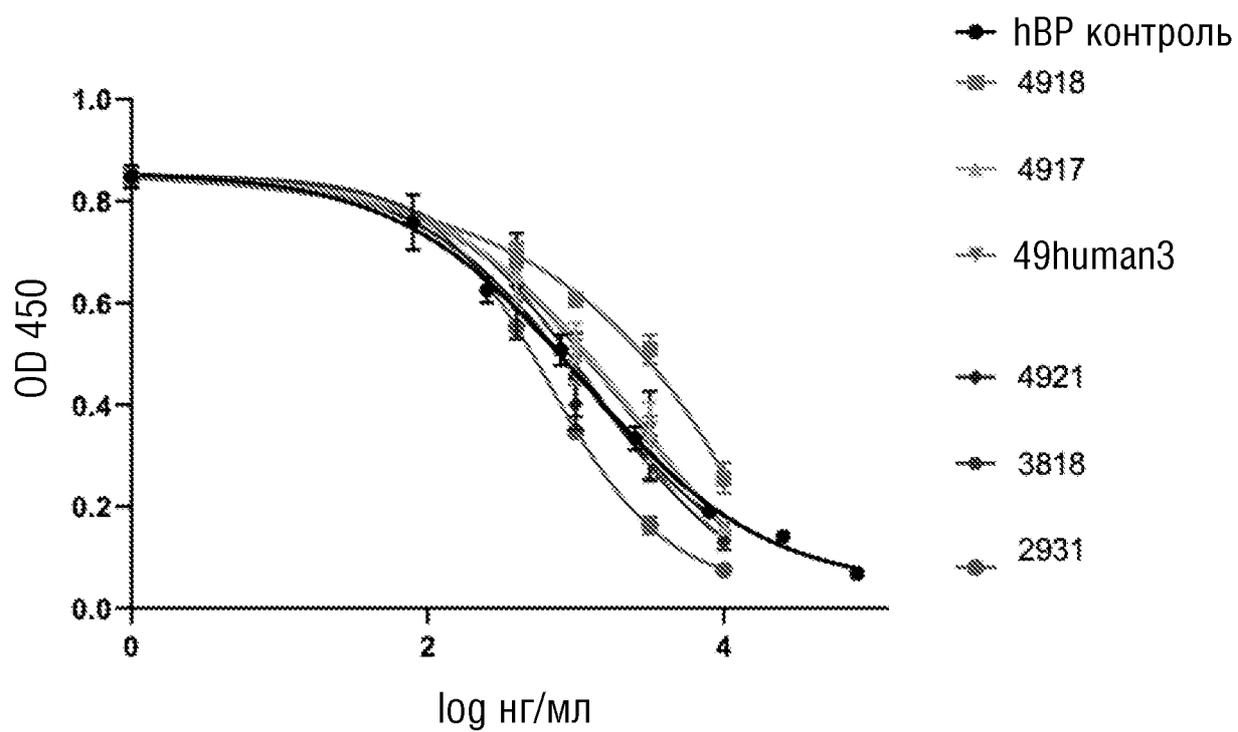
	70	80	90	100	110																																																
hBP VL	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	112
IGKV2-30*02	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	G	T	H	W	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	112
hBP_VK_hu1 VL	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	112
hBP_VK_hu2 VL	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	112
hBP_VK_hu3 VL	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	112

Отметка 'Отметка #1': Заключенные в рамку остатки, которые точно соответствуют IGKV2-30*02

- hBP VL (SEQ ID NO:78)
- IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:1)
- hBP_VK_hu1 VL (SEQ ID NO:2)
- hBP_VK_hu2 VL (SEQ ID NO:101)
- hBP_VK_hu3 VL (SEQ ID NO:102)

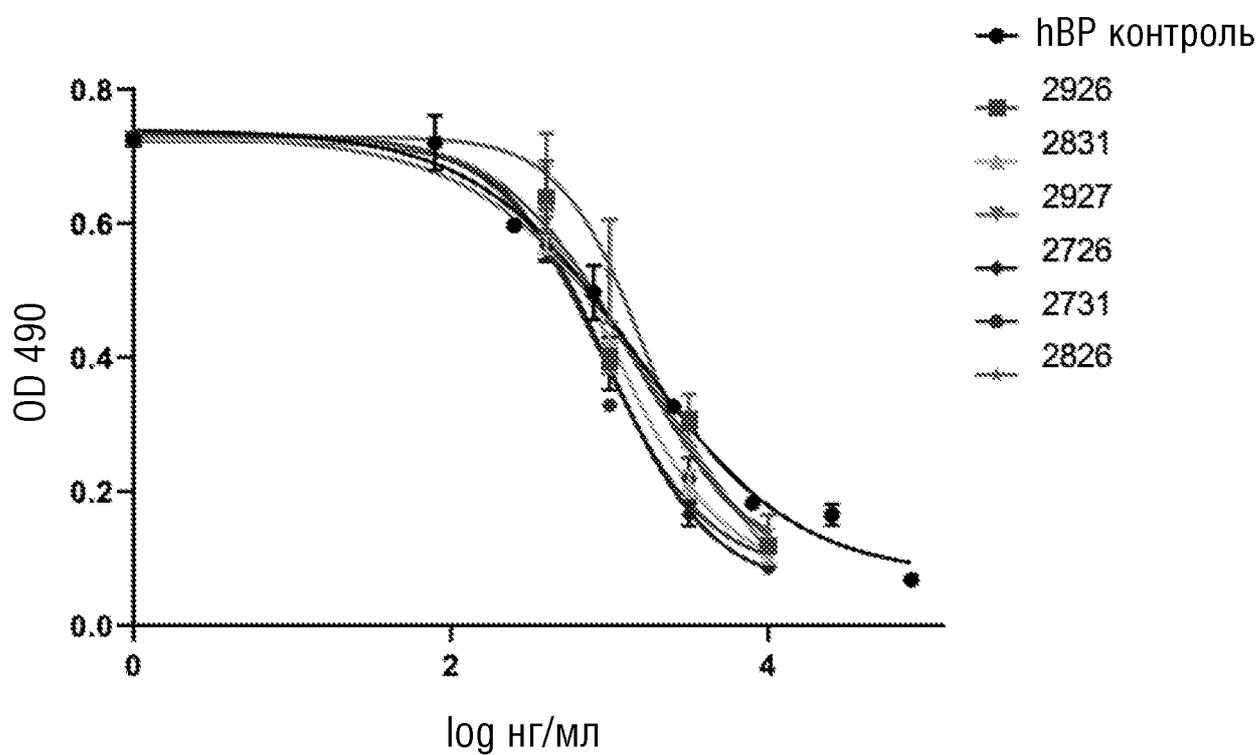
ФИГ.2

Конкурентный ELISA на фибриллах A β 42
Биотинилированный hBP по сравнению с mAbs



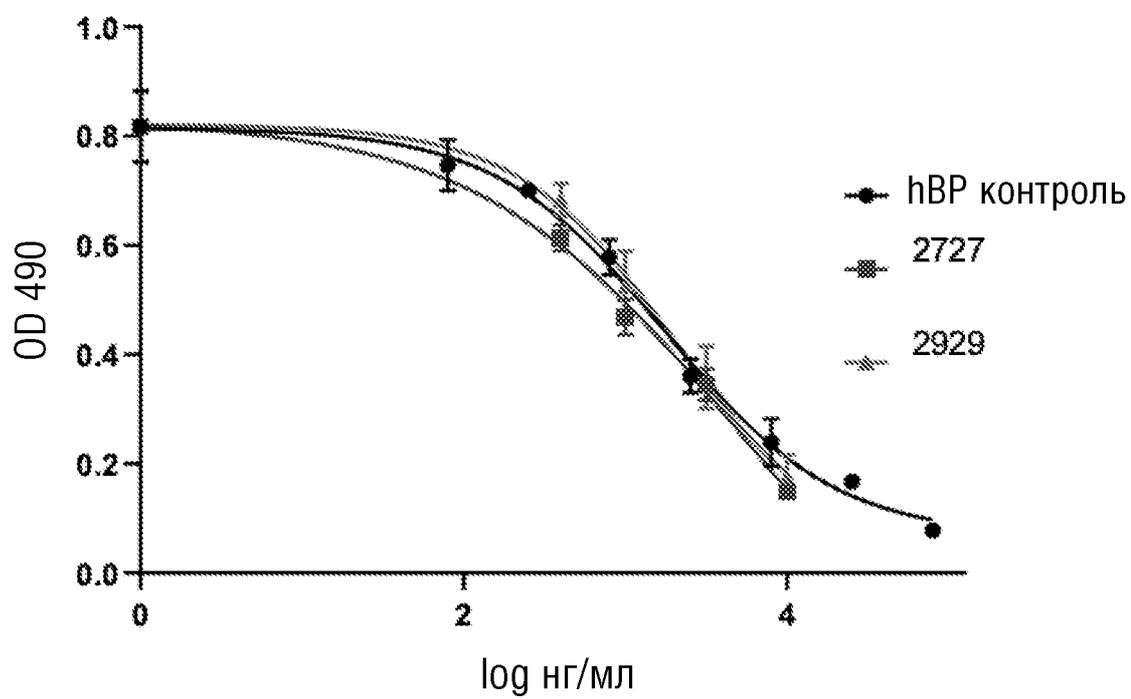
ФИГ.3

Конкурентный ELISA на фибриллах A β 42
Биотинилированный hBP по сравнению с mAbs



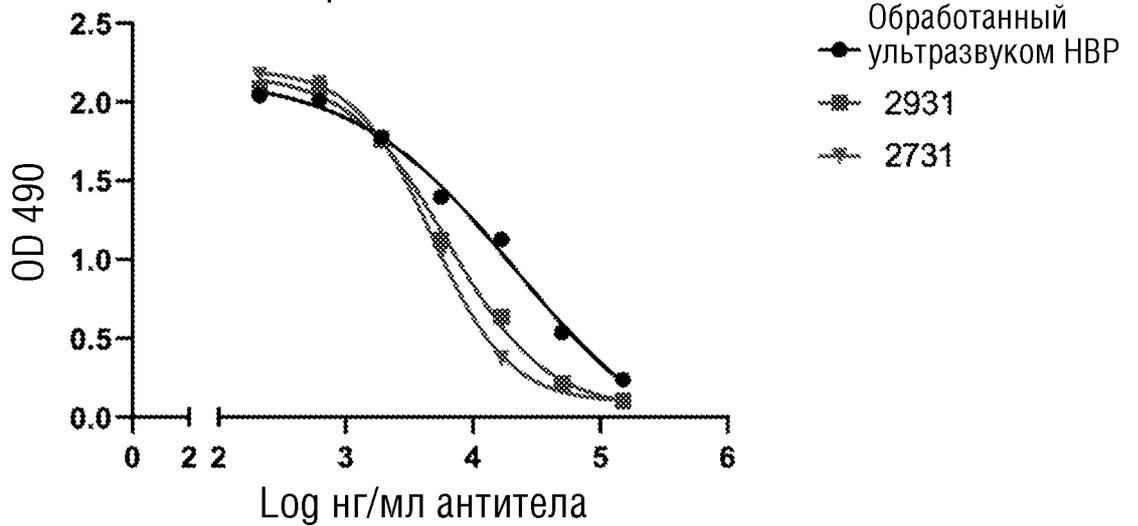
ФИГ.4

Конкурентный ELISA на фибриллах A β 42
Биотинилированный hBP по сравнению с mAbs



ФИГ.5А

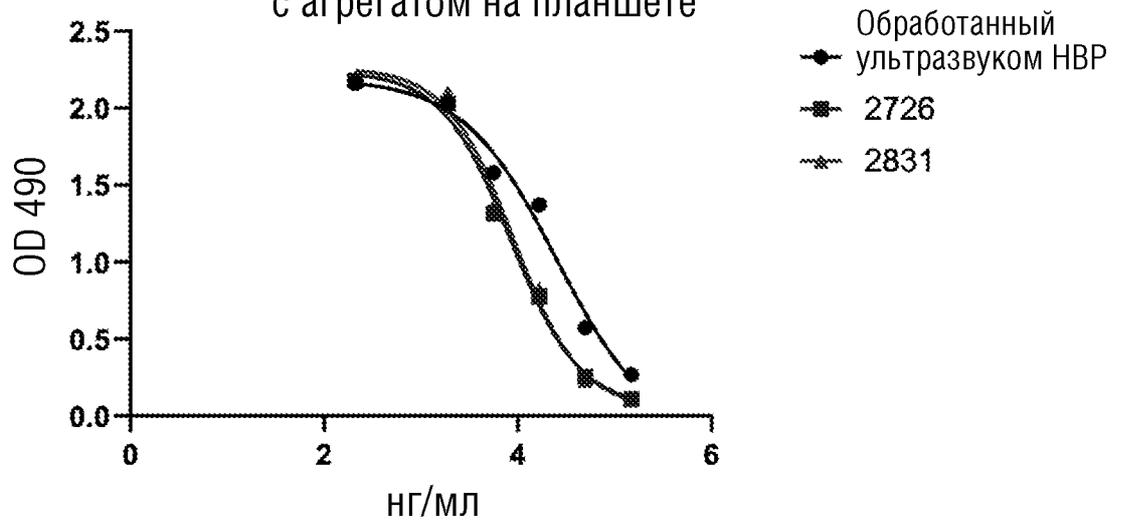
Анализ активности
Конкуренция антитела и биотинилированного hBP за связывание
с агрегатом на планшете



Антитело	hBP	2931	2731
IC50	21265	6273	4763

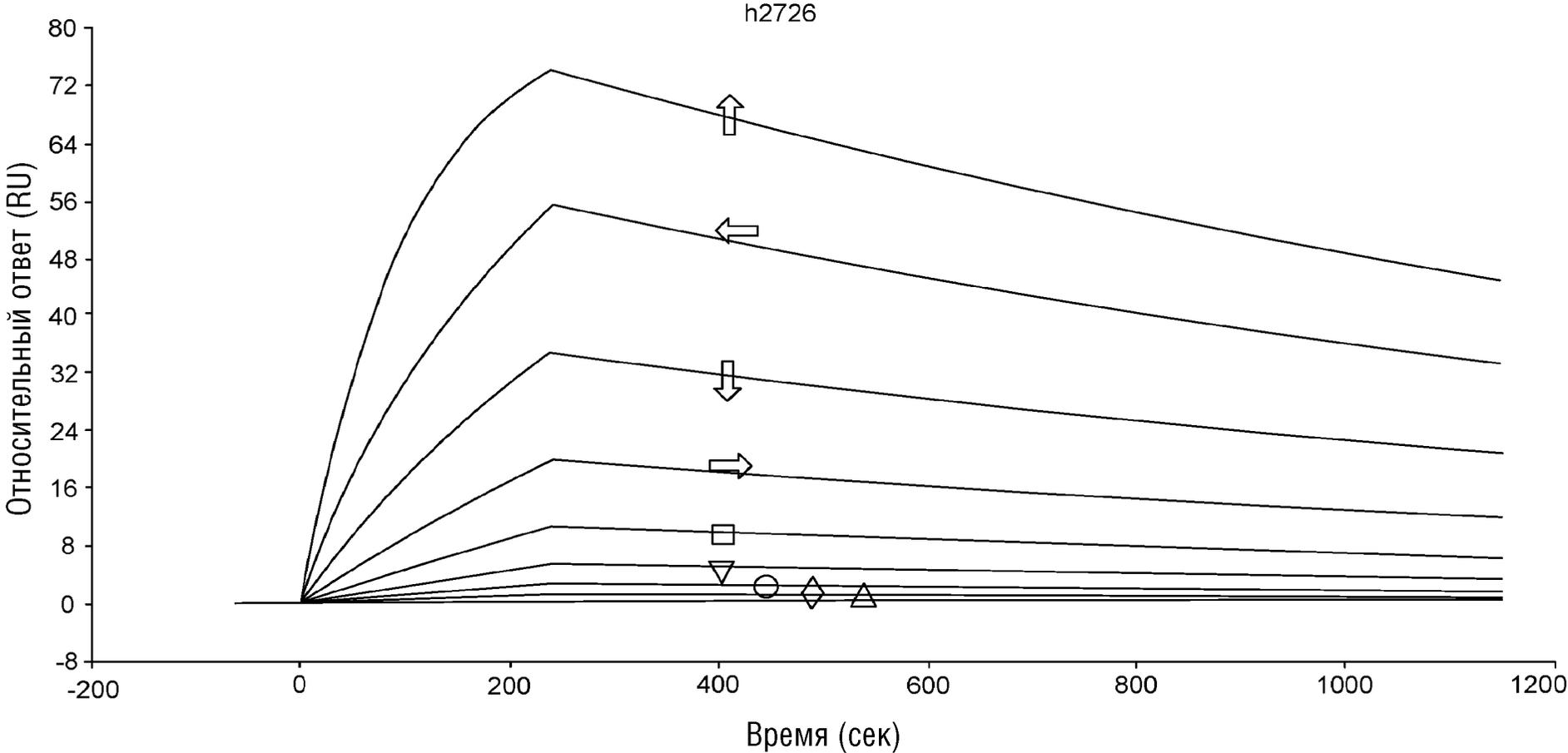
ФИГ.5В

Анализ активности
Конкуренция антитела и биотинилированного hBP за связывание
с агрегатом на планшете



Антитело	hBP	2726	2831
IC50	25072	8409	9016

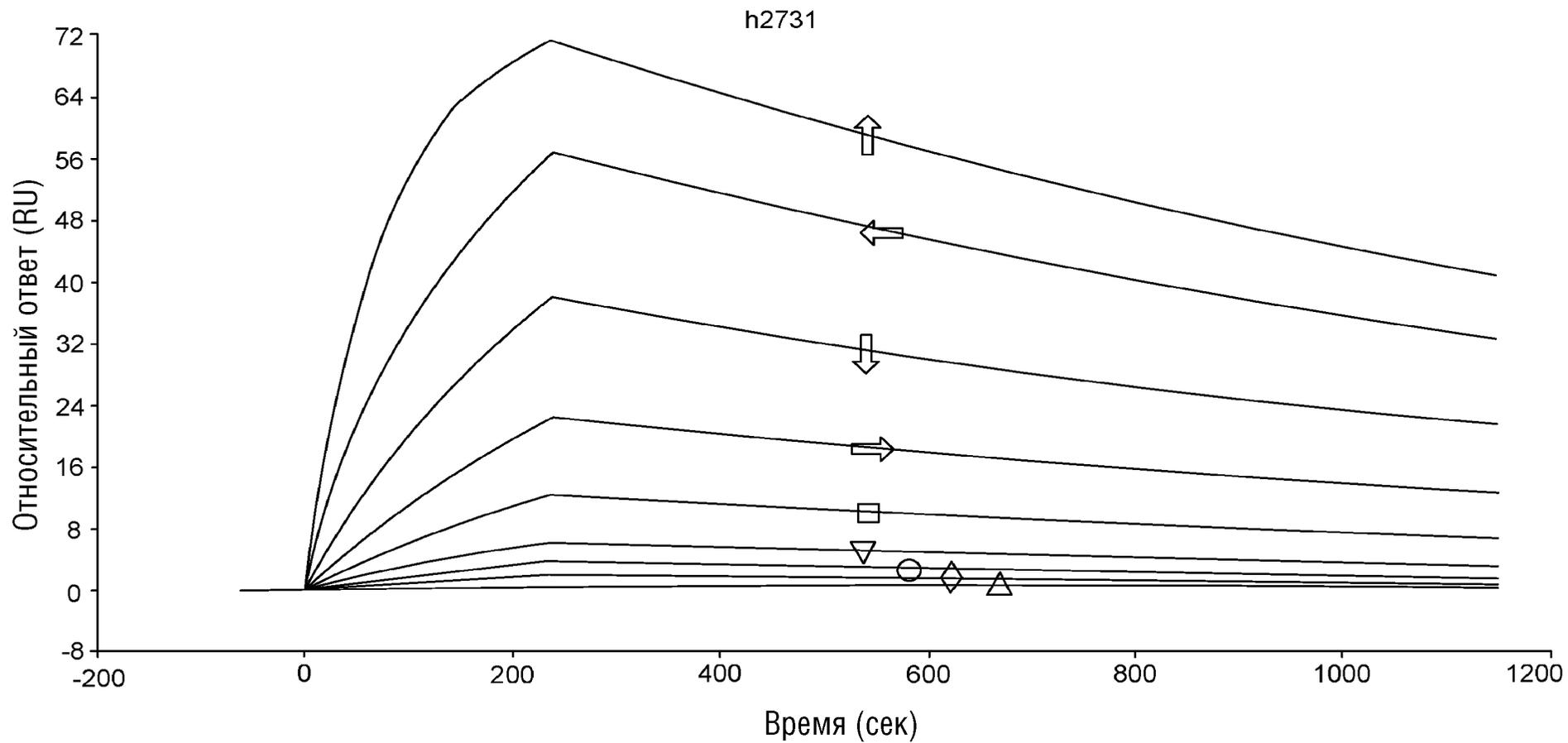
ФИГ.6А



6/39

↑ 100 нМ ◇ 0.78125 нМ ⇌ 12.5 нМ ⇌ 50 нМ △ 0.3906 нМ □ 6.25 нМ ○ 1.5625 нМ ▽ 3.125 нМ ↓ 25 нМ

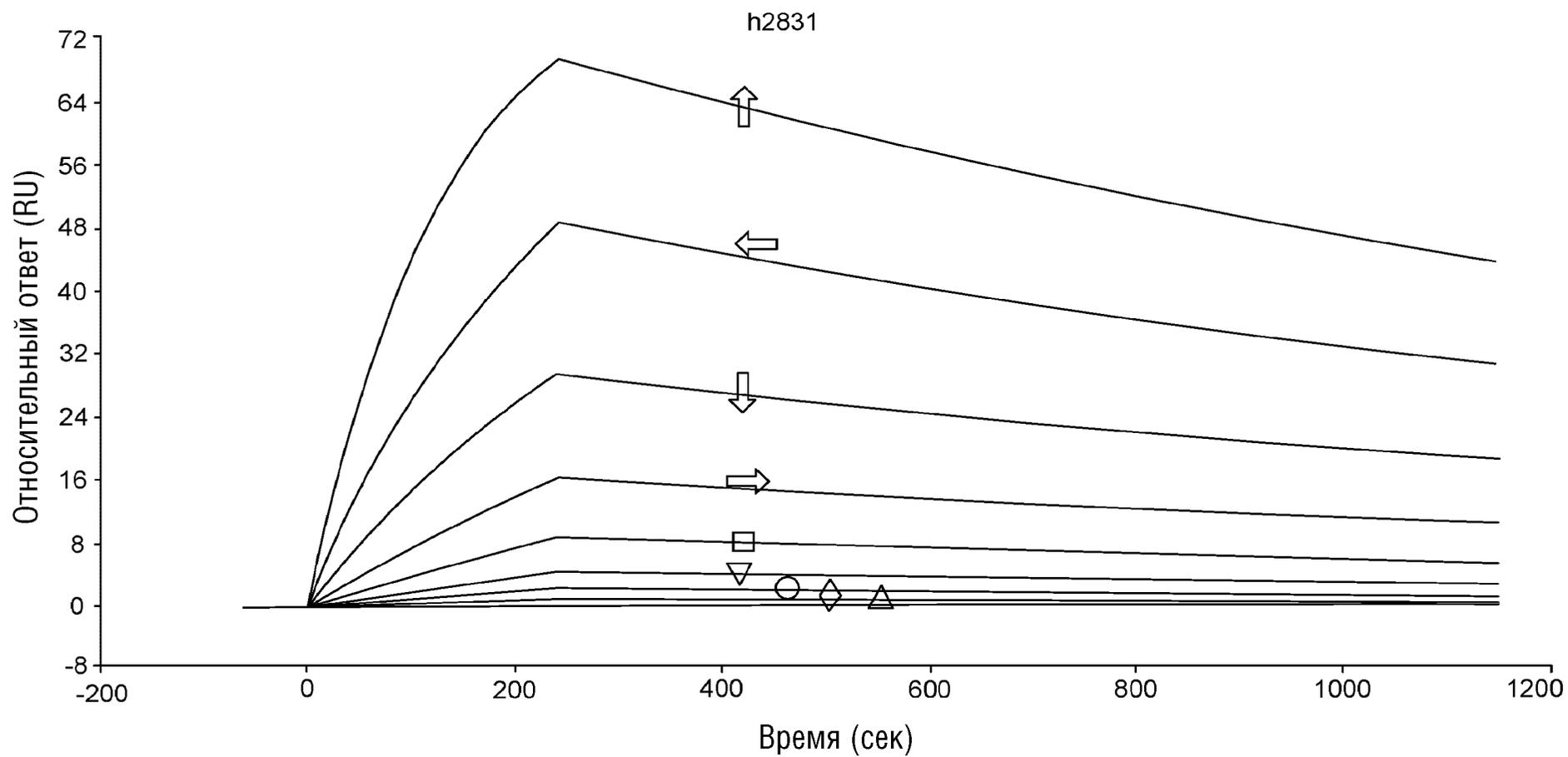
ФИГ.6В



7/39

↑ 100 нМ ◇ 0.78125 нМ ⇌ 12.5 нМ ⇌ 50 нМ △ 0.3906 нМ □ 6.25 нМ ○ 1.5625 нМ ▽ 3.125 нМ ↓ 25 нМ

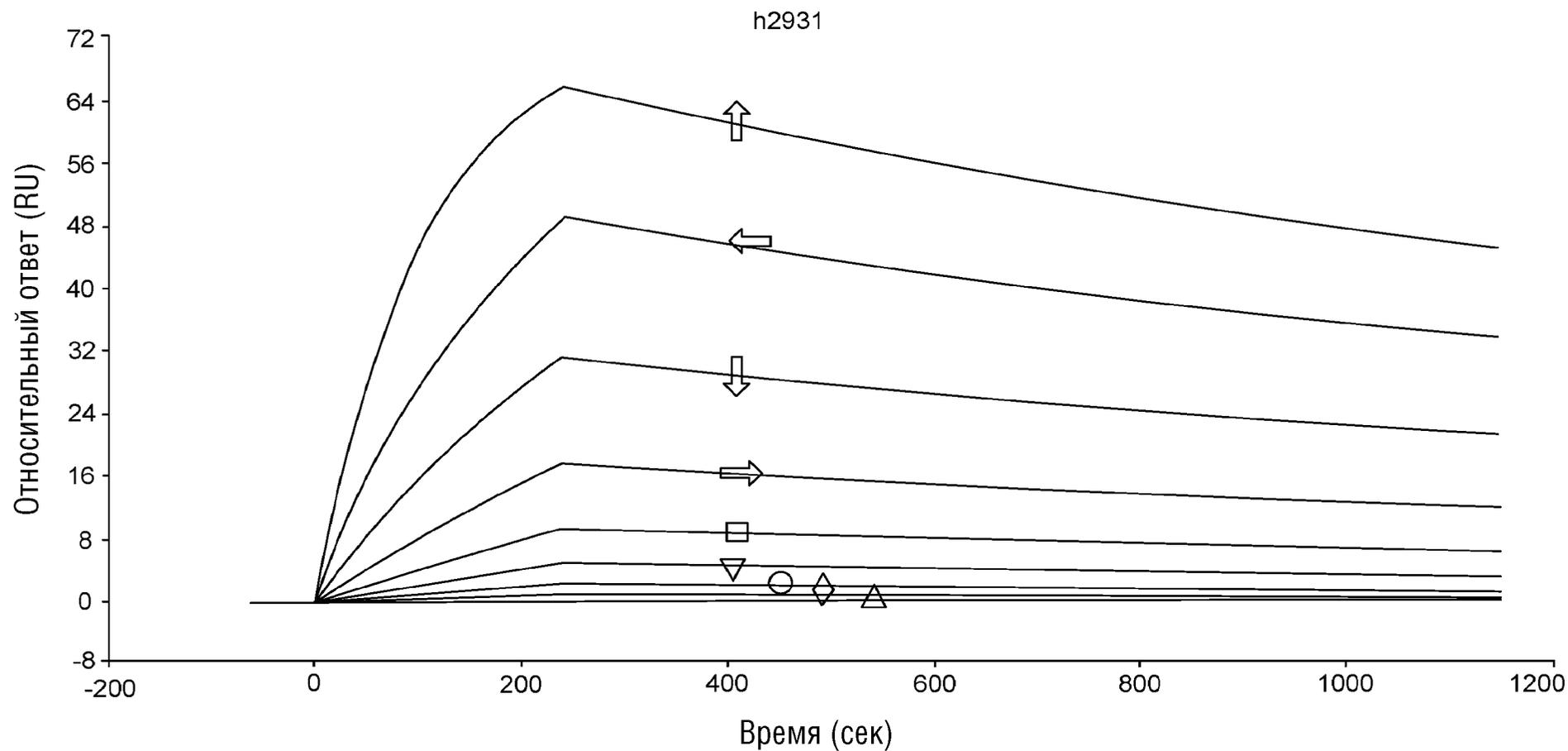
ФИГ.6С



8/39

↑ 100 нМ ◇ 0.78125 нМ ⇒ 12.5 нМ ⇐ 50 нМ △ 0.3906 нМ □ 6.25 нМ ○ 1.5625 нМ ▽ 3.125 нМ ⊕ 25 нМ

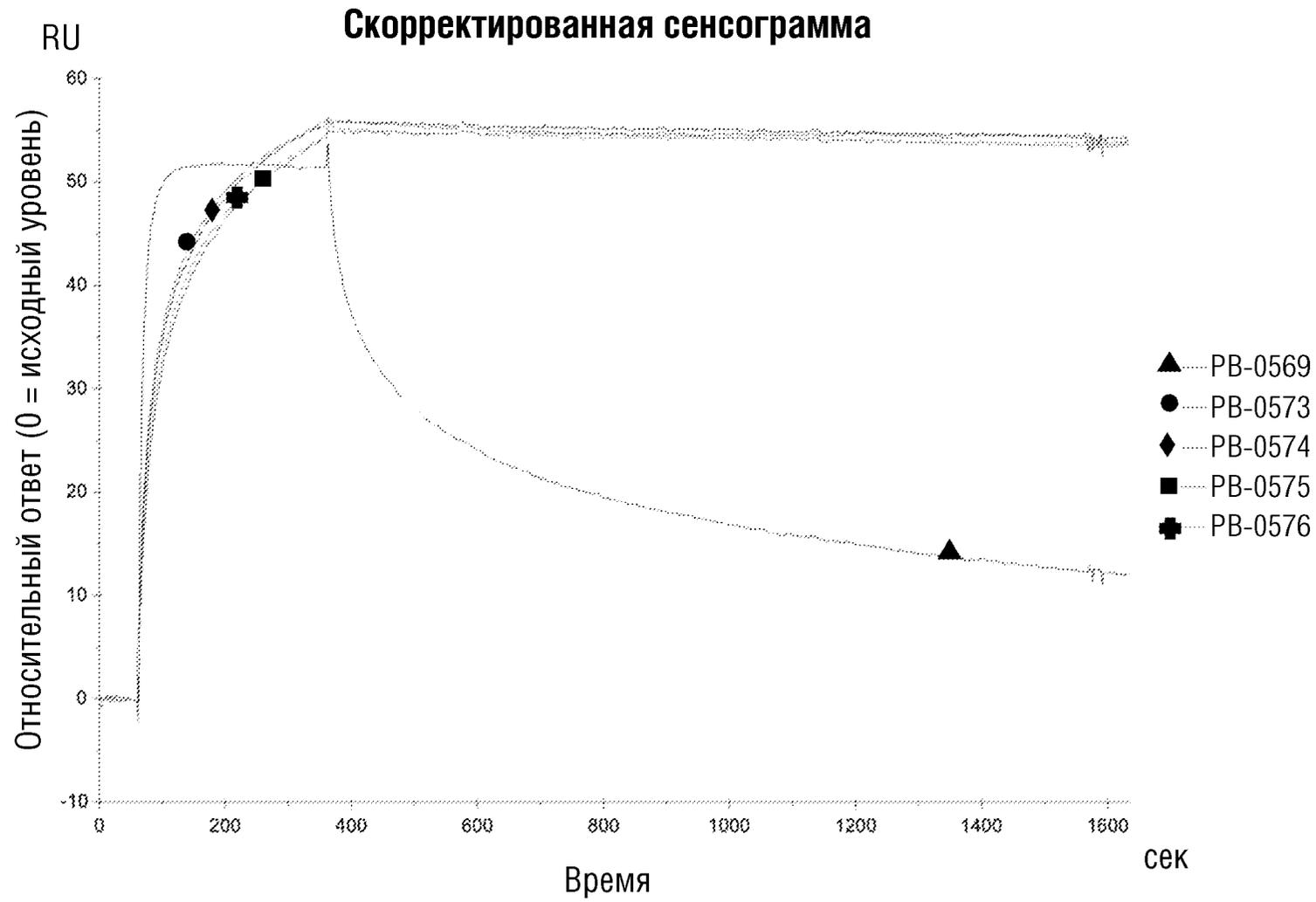
ФИГ.6D



9/39

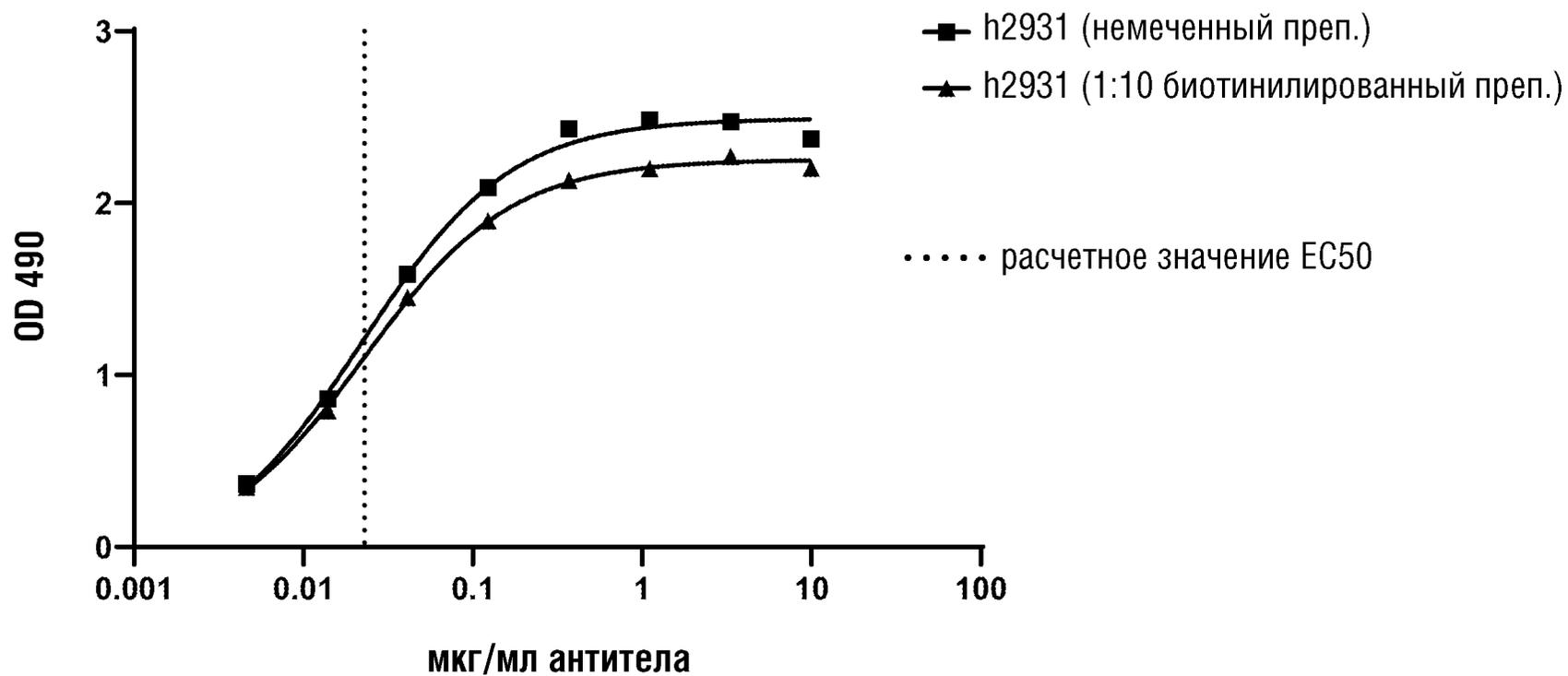
↑ 100 нМ ◊ 0.78125 нМ ⇨ 12.5 нМ ⇩ 50 нМ △ 0.3906 нМ □ 6.25 нМ ○ 1.5625 нМ ▽ 3.125 нМ ↓ 25 нМ

ФИГ.7



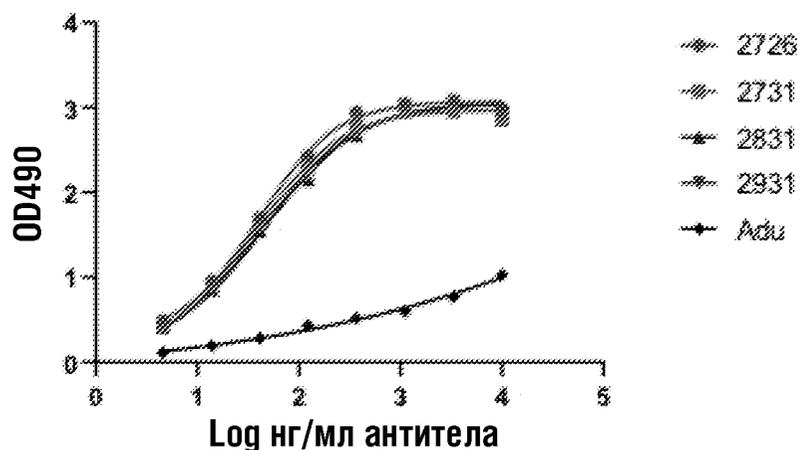
ФИГ.8

Титрование h2931 на 2.5 мкг/мл препаратов олигомеров A β



ФИГ.9

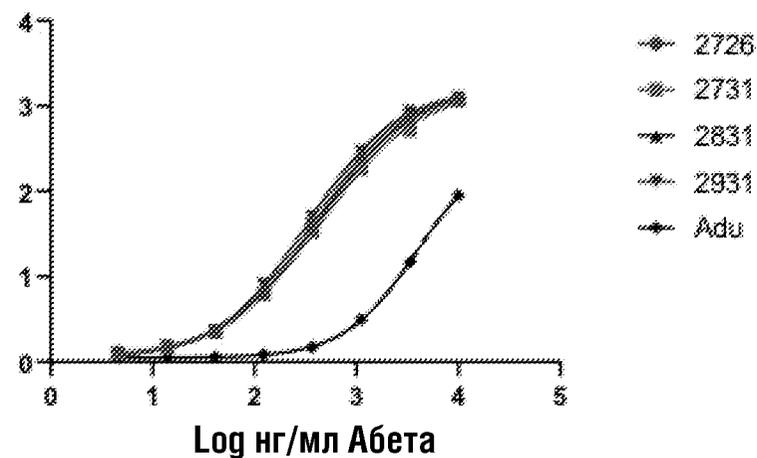
Титр антитела в 2.5 мкг/мл Абета фибрилл



	2726	2731	2831	2931	Adu
IC50	40.27	38.66	46.19	43.53	~ 4.357e+021

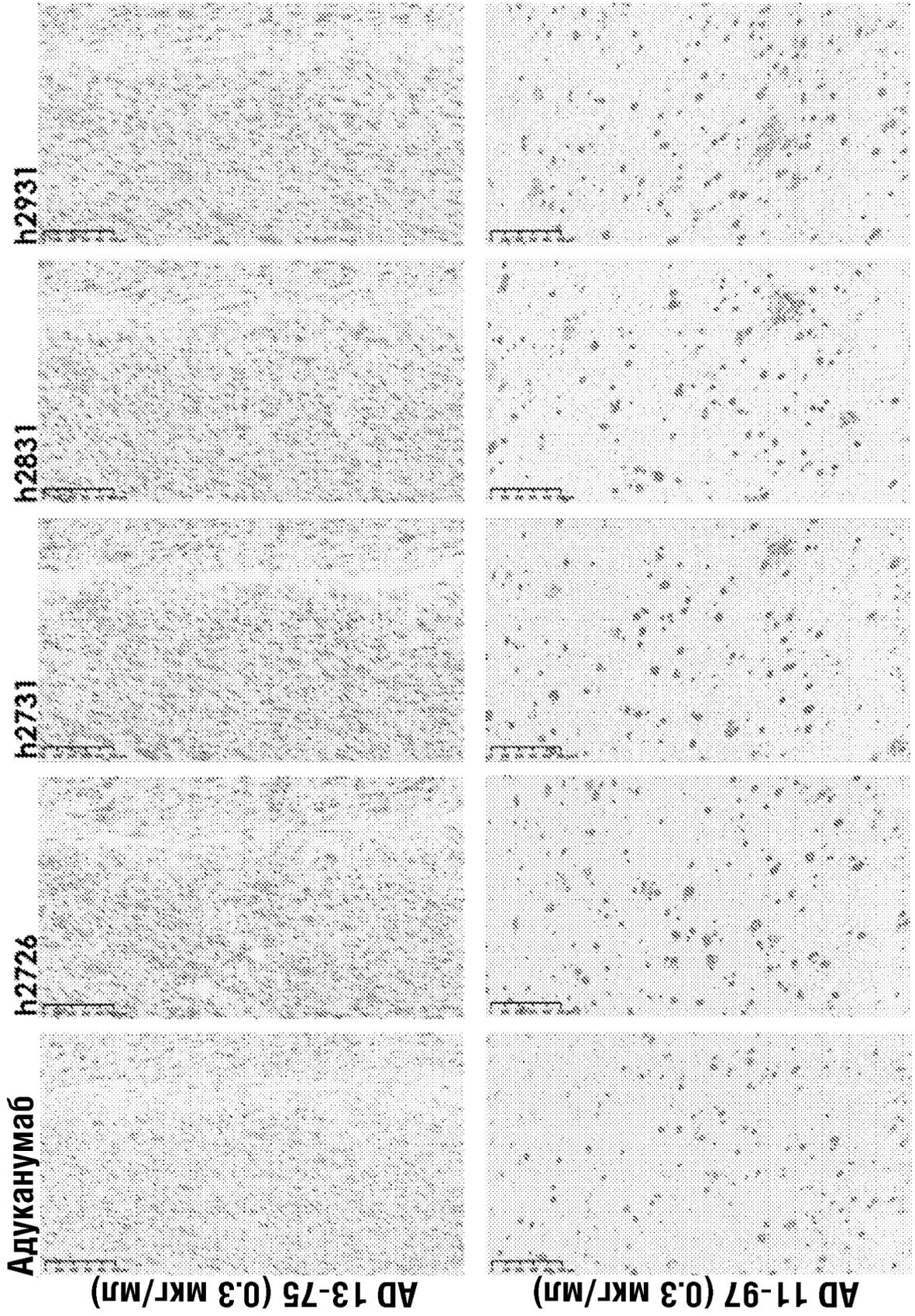
Невозможно определить EC50 с использованием 4 параметров для Adu, на глаз ~220 нг/мл

Титр аБета фибрилл для покрытия планшета. Антитело подверживали при постоянной концентрации 2 мкг/мл



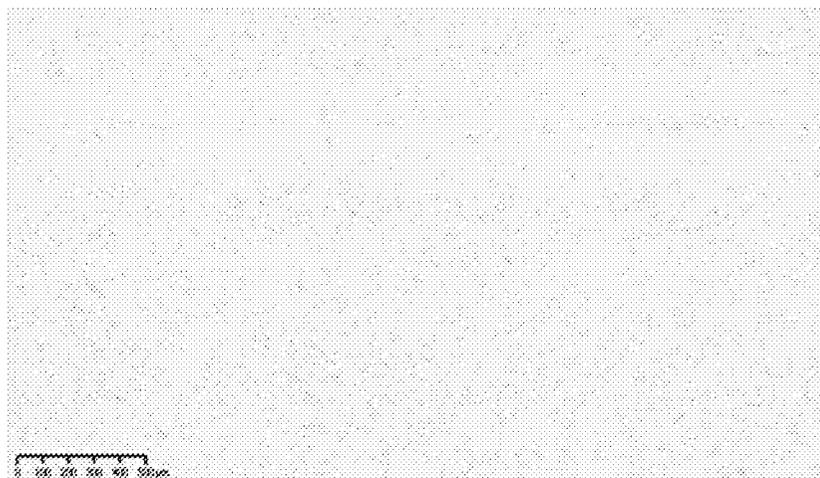
	2726	2731	2831	2931	Adu
IC50	387.2	440.2	412.4	334.5	4010

ФИГ.10

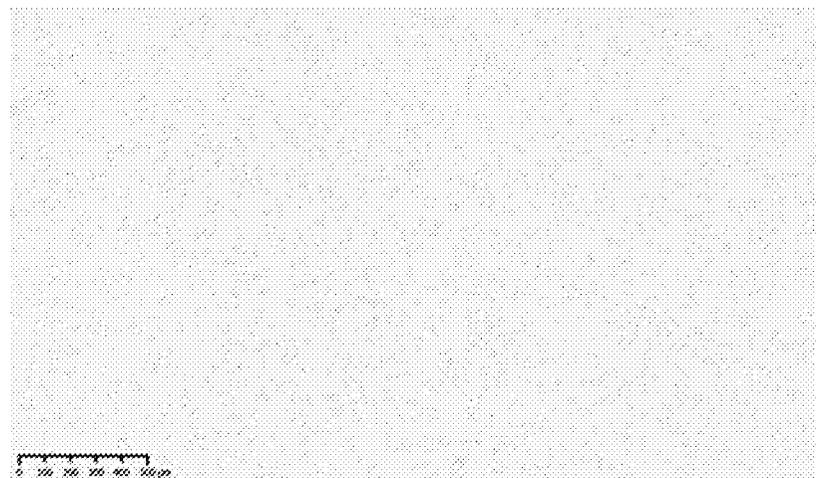


ФИГ.11

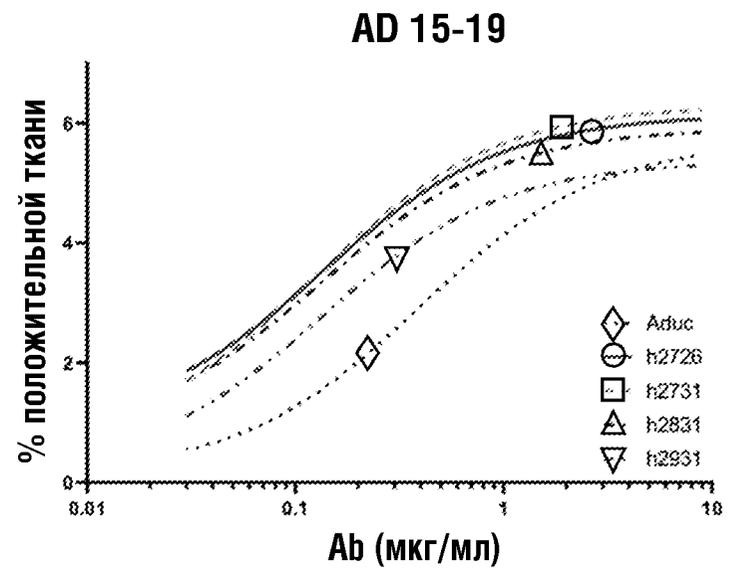
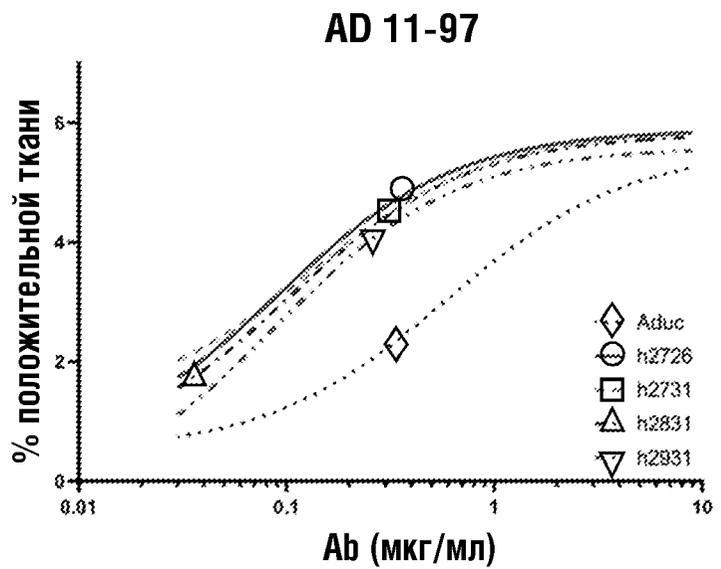
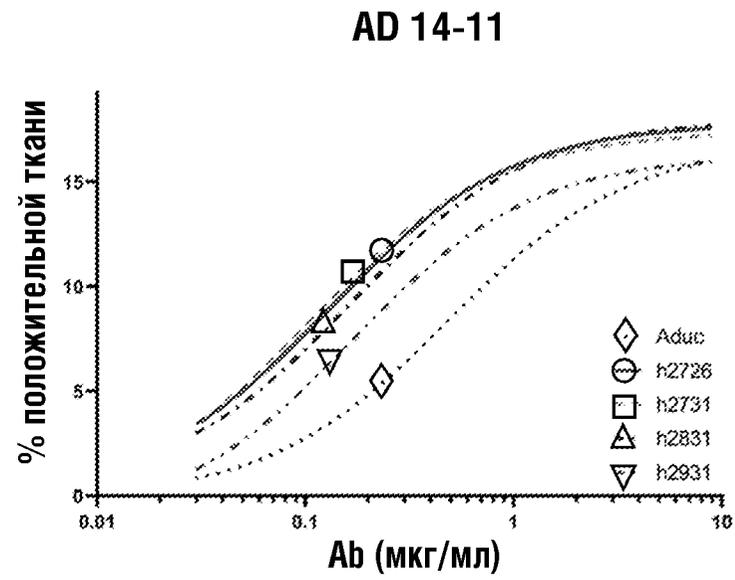
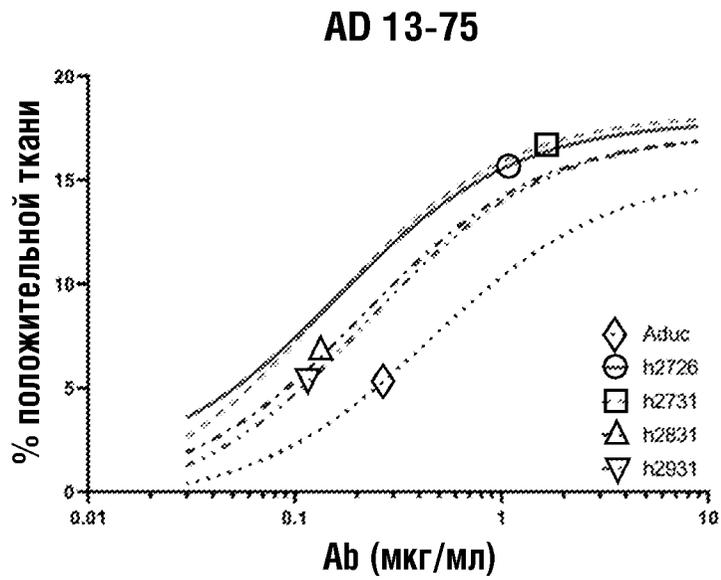
AD 13-75 (hlgG изотип 1 мкг/мл)



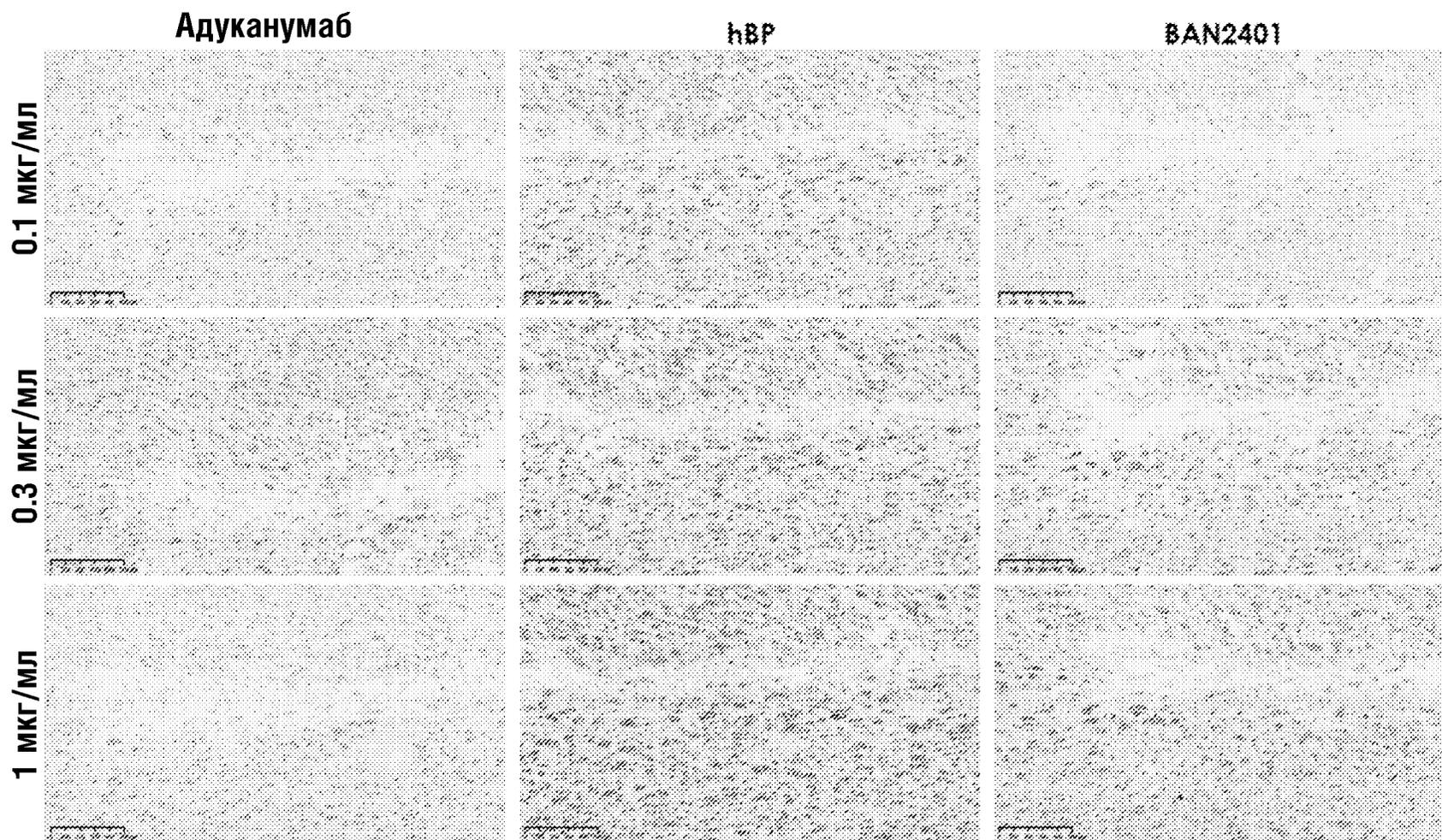
AD 11-97 (hlgG изотип 1 мкг/мл)



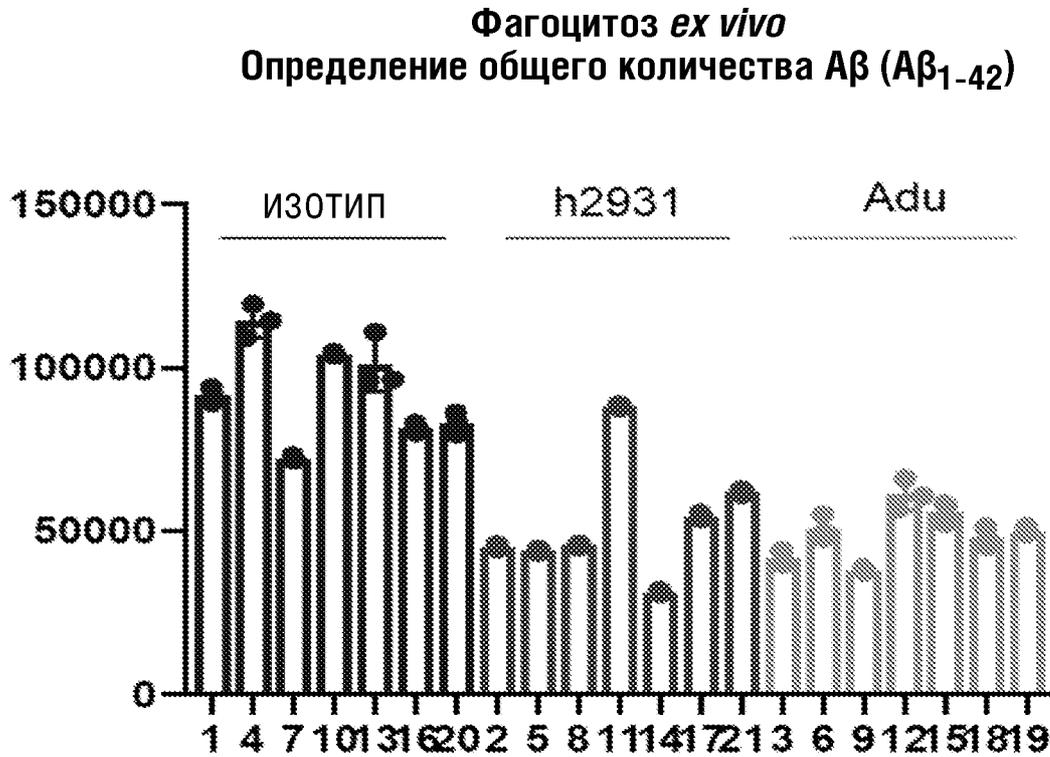
ФИГ.12



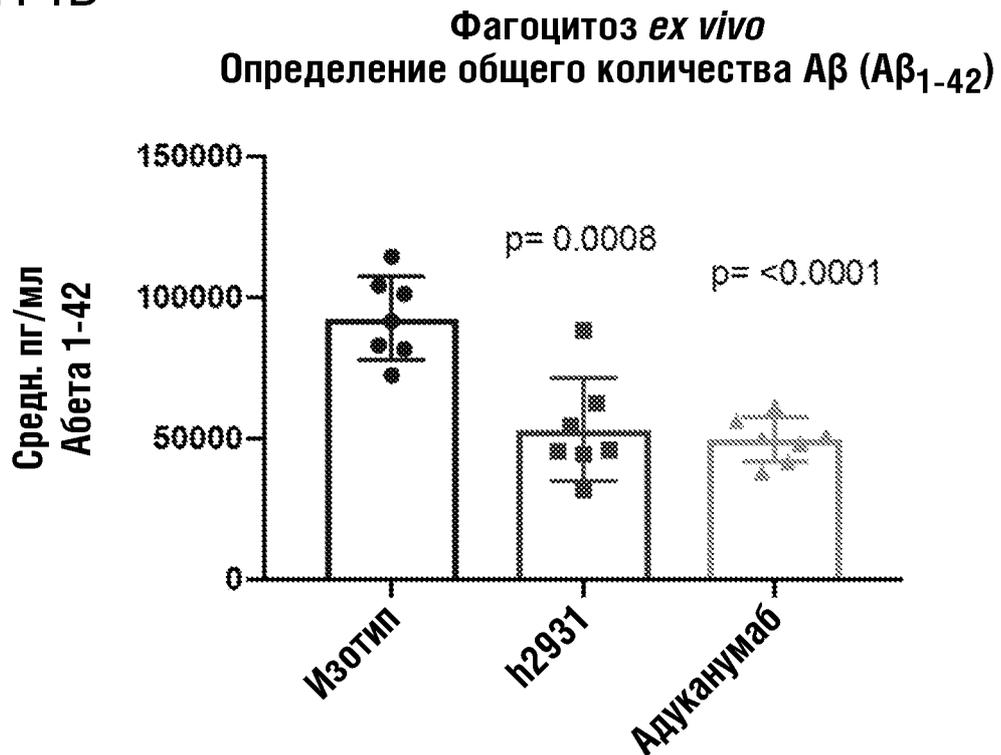
ФИГ.13



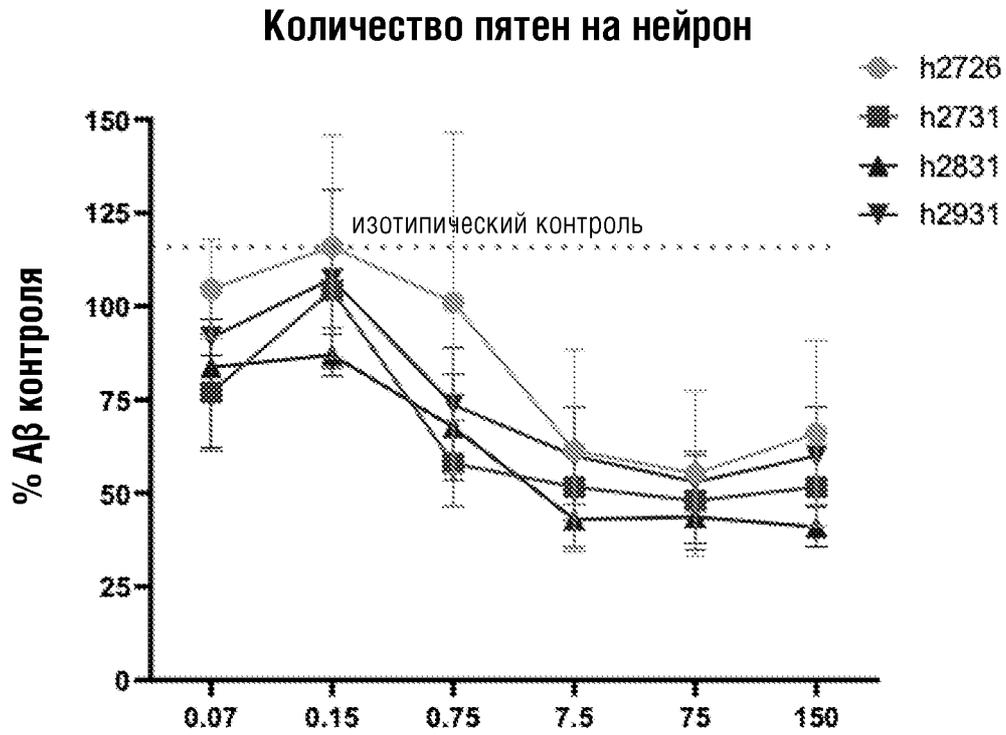
ФИГ.14А



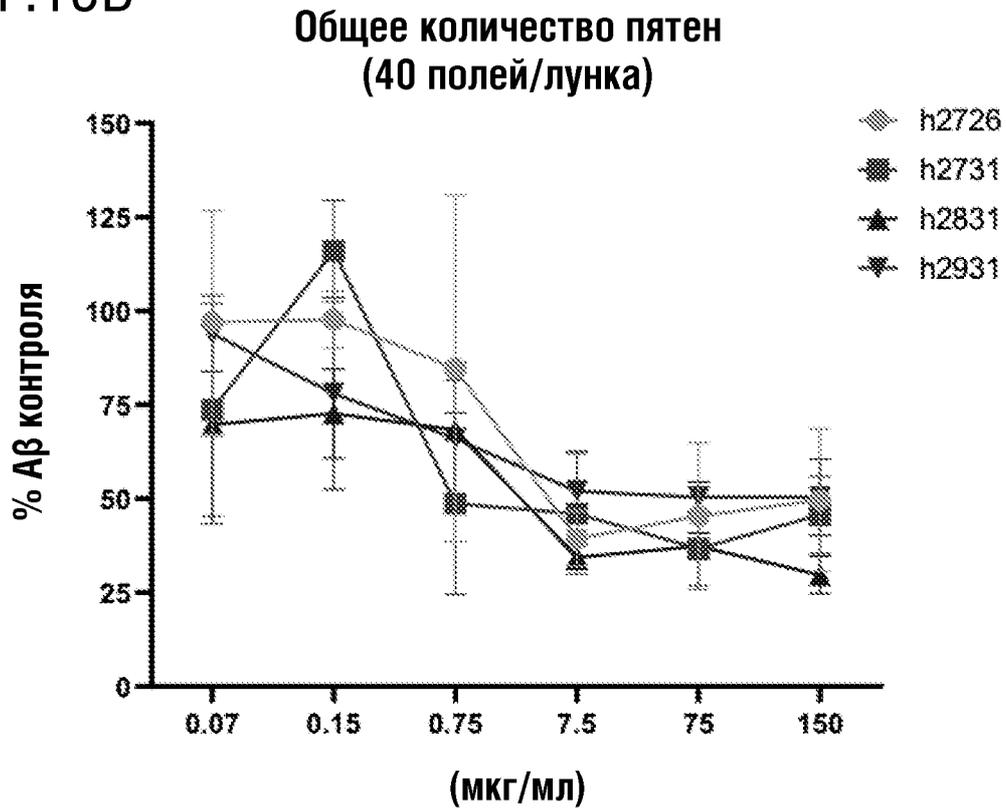
ФИГ.14В



ФИГ.15А

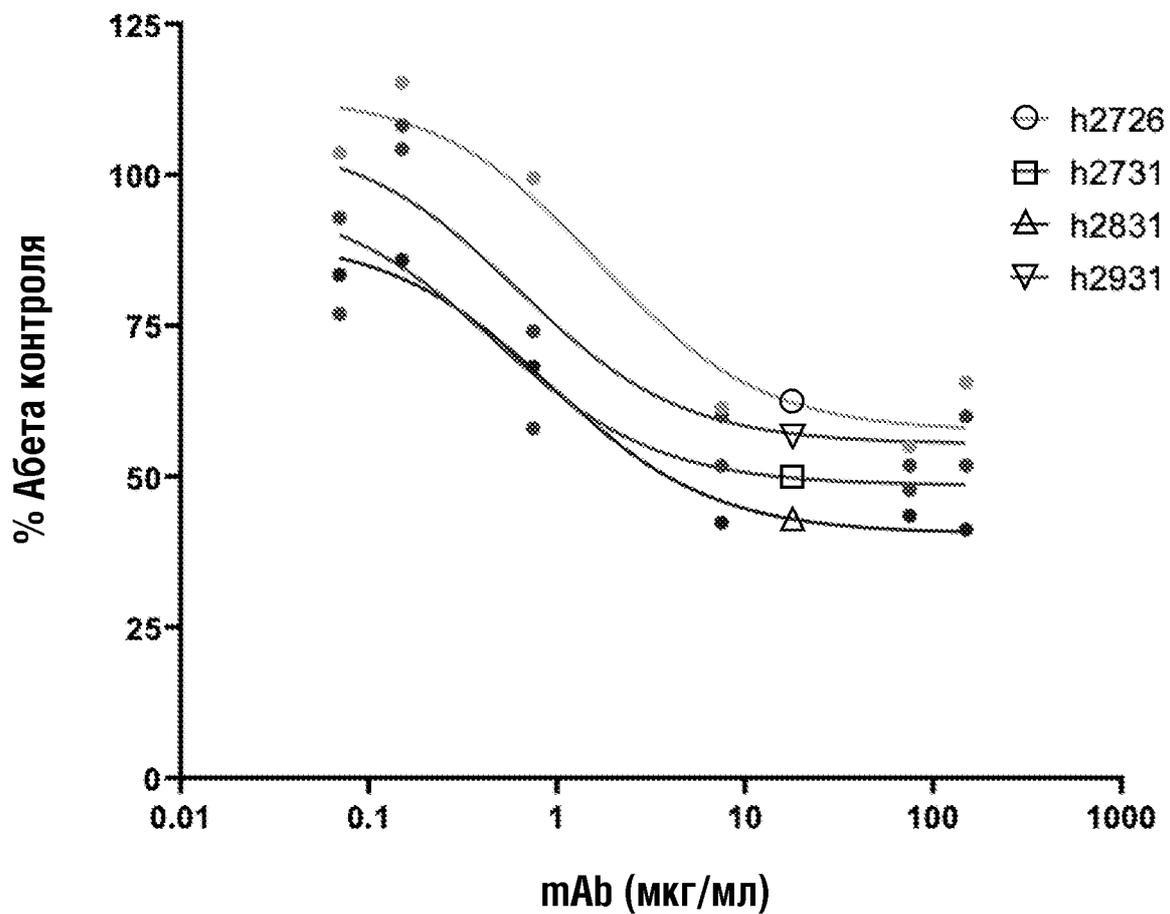


ФИГ.15В



ФИГ.16

Количество А β пятен на нейрон
(нормализованное к необработанному Абета)



	h2726	h2731	h2831	h2931
IC50	1.672	0.4700	0.9240	0.6270

	h2726	h2731	h2831	h2931
Общая площадь	9067	7523	6502	8481

ФИГ.17

	10	20	30	40	
hBP VH	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y G M S W V R Q A				40
Hm27Lm26_VH	40
Hm27Lm31_VH	40
Hm28Lm31_VH	.	.	.	F	40
Hm29Lm31_VH	.	.	.	F	40
	50	60	70	80	
hBP VH	P G K G L E W V A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F T I S R D N S K N T L Y				80
Hm27Lm26_VH	.	.	.	S	80
Hm27Lm31_VH	.	.	.	S	80
Hm28Lm31_VH	.	V	.	S	80
Hm29Lm31_VH	.	V	.	S	80
	90	100	110		
hBP VH	L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V R Y D H Y S G S S D Y W G Q G T L V T V S S				119
Hm27Lm26_VH	119
Hm27Lm31_VH	119
Hm28Lm31_VH	.	.	.	T	119
Hm29Lm31_VH	.	.	T	T	119

20/39

CDR выделены жирным шрифтом

ФИГ.18

	----- ----- ----- ----- -----	
	10 20 30 40	
<u>hBP_LC</u>	DV VMTQ S P L S L P V T P G E P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W	40
Hm27Lm26_VL	40
Hm27Lm31_VL L	40
Hm28Lm31_VL L	40
Hm29Lm31_VL L	40
	----- ----- ----- ----- -----	
	50 60 70 80	
<u>hBP_LC</u>	L L Q K P G Q S P Q R L I Y L V S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I	80
Hm27Lm26_VL K . . N R	80
Hm27Lm31_VL R . T N R . T	80
Hm28Lm31_VL R . T N R . T	80
Hm29Lm31_VL R . T N R . T	80
	----- ----- ----- ----- -----	
	90 100 110 120	
<u>hBP_LC</u>	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V	112
Hm27Lm26_VL	112
Hm27Lm31_VL S	112
Hm28Lm31_VL S	112
Hm29Lm31_VL S	112
	----- ----- ----- ----- -----	
	130 140 150 160	
<u>hBP_LC</u>	F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q	160
Hm27Lm26_VL	112
Hm27Lm31_VL	112
Hm28Lm31_VL	112
Hm29Lm31_VL	112
	----- ----- ----- ----- -----	
	170 180 190 200	
<u>hBP_LC</u>	S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E	200
Hm27Lm26_VL	112
Hm27Lm31_VL	112
Hm28Lm31_VL	112
Hm29Lm31_VL	112
	----- ----- ----- ----- -----	
	210	
<u>hBP_LC</u>	V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	219
Hm27Lm26_VL	112
Hm27Lm31_VL	112
Hm28Lm31_VL	112
Hm29Lm31_VL	112

CDR выделены жирным шрифтом

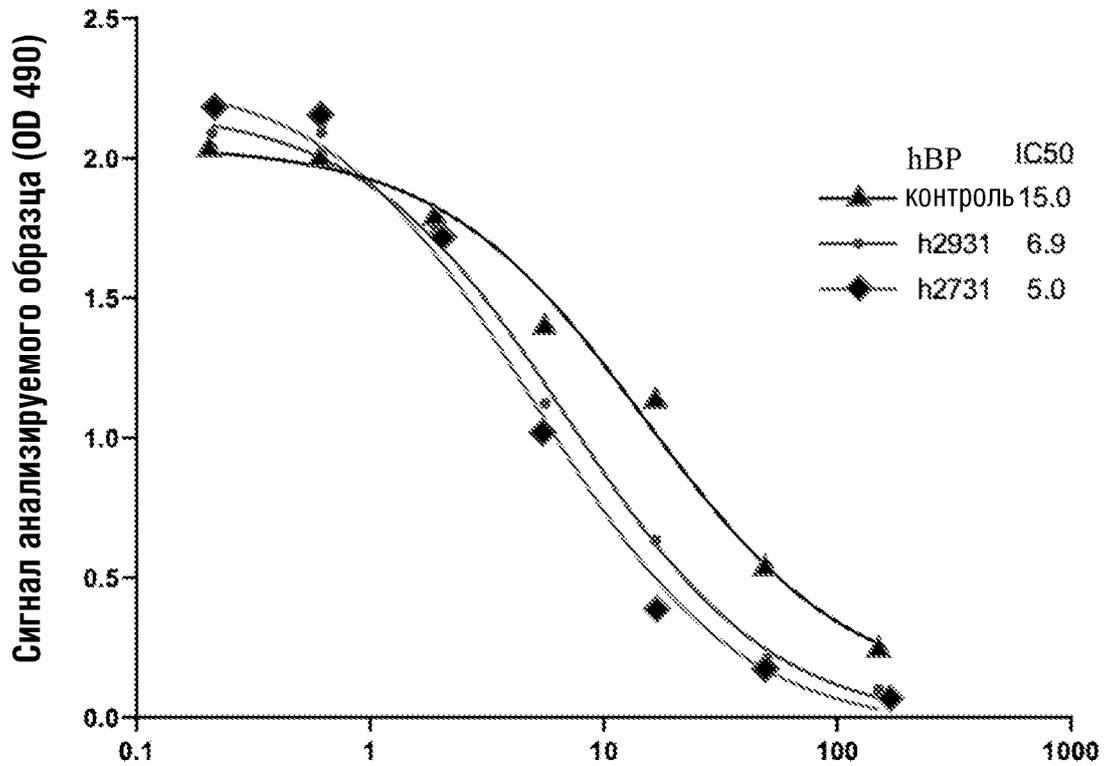
ФИГ.19А

# H-CDRs	Клон ID	CDR1	SEQ ID	CDR2	SEQ ID	CDR3	SEQ ID	VH SEQ ID
		aa 26-35		aa 50-66		aa 99-108		
	Bapi	GFTFS NYGMS	16	SIRSG GGRTY YSDNV KG	17	YDHYS GSSDY	18	1
1	h2726	GFTFS NYGMS	16	SIRSG SG RTY YSDNV KG	20	YDHYS GSSDY	18	3
2	h2731	GFTFS NYGMS	16	SIRSG SG RTY YSDNV KG	20	YDHYS GSSDY	18	3
3	h2831	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHYS GT SDY	24	4
4	h2931	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHY T GT SDY	25	5
5	h2926	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHY T GT SDY	25	5
6	h4921G	GFTFS NFG MS	19	SV RSG GGRTY YSDNV KG	22	YDHYS GT SDY	24	6
7	h2826	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHYS GT SDY	24	4
8	h2929	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHY T GT SDY	25	5
9	h3818G	GFT FA NYGMS	20	SV RSG GS RTY YSDNV KG	23	YDHYS GSSDY	18	7
10	h2927	GFTFS NFG MS	19	SV RSG SG RTY YSDNV KG	21	YDHY T GT SDY	25	5
11	h49k3G	GFTFS NFG MS	19	SV RSG GGRTY YSDNV KG	22	YDHYS GT SDY	24	6
12	h4917G	GFTFS NFG MS	19	SV RSG GGRTY YSDNV KG	22	YDHYS GT SDY	24	6
13	h2727	GFTFS NYGMS	16	SIRSG SG RTY YSDNV KG	20	YDHYS GSSDY	18	3
14	h4918G	GFTFS NFG MS	19	SV RSG GGRTY YSDNV KG	22	YDHYS GT SDY	24	6

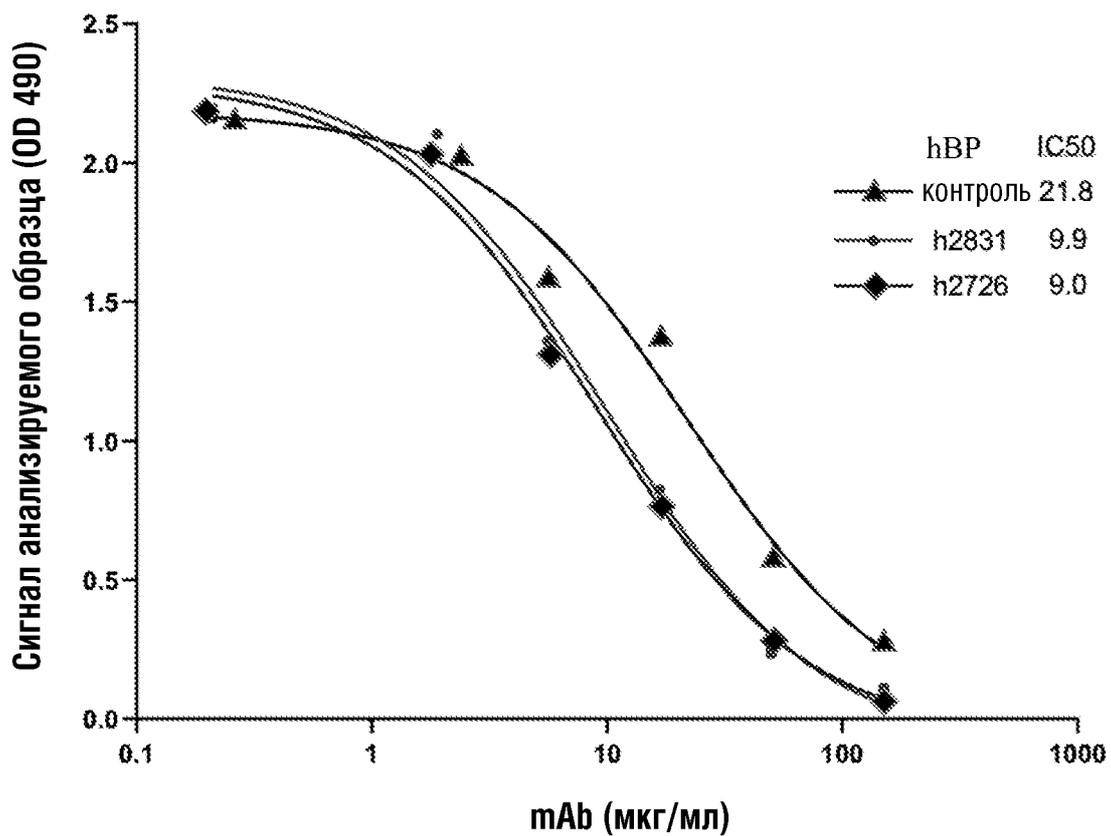
ФИГ.19В

# L-CDRs	Клон ID	CDR1	SEQ ID	CDR2	SEQ ID	CDR3	SEQ ID	VL SEQ ID
		aa 24-39		aa 55-61		aa 94-102		
	Bapi	KSSQS LLDSD GKTYL N	26	LVSKL DS	27	WQGTG FPRT	28	2
1	h2726	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	KVSNR DS	33	WQGTG FPRT	28	8
2	h2731*	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	RVTNR DT	34	WQGTG FPRS	38	9
3	h2831*	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	RVTNR DT	34	WQGTG FPRS	38	9
4	h2931*	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	RVTNR DT	34	WQGTG FPRS	38	9
5	h2926	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	KVSNR DS	33	WQGTG FPRT	28	8
6	H4921G*	KSSQS LLDSD GKTYL N	26	RVTNR DT	34	WQGTG FPRT	28	10
7	h2826	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	KVSNR DS	33	WQGTG FPRT	28	8
8	h2929	RSSQS LVDYD GKTYL N	31	KVSNR DS	33	WQGTG FPRS	39	11
9	h3818G*	KSSQS LMDTD GKTYL N	32	KVSNR ES	35	WQGTG FPRT	28	12
10	h2927	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	KVSNR DS	33	WQGTG FPRS	38	13
11	h49k3G*	KSSQS LLDSD GKTYL N	26	KVSNR DS	33	WQGTG FPRT	28	14
12	h4917G*	KSSQS LLDSD GKTYL N	26	KVTNR ES	36	WQGTG FPRS	38	15
13	h2727	KSSQS LLDYD GKTYL N	29	KVSNR DS	33	WQGTG FPRS	38	13
14	h4918G*	KSSQS LMDTD GKTYL N	32	KVSNR ES	35	WQGTG FPRT	28	12
	* = LC P15L							

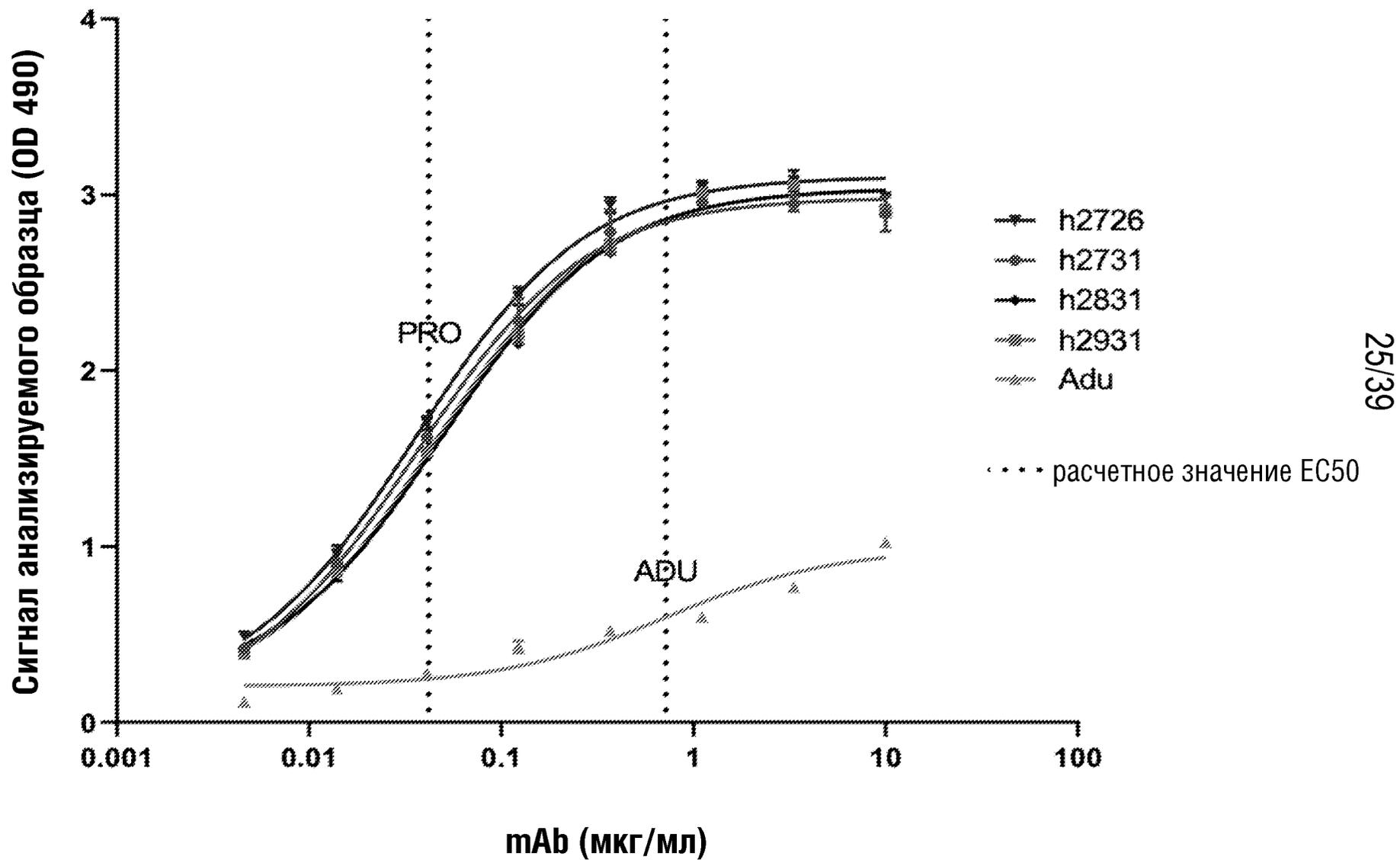
ФИГ.20А



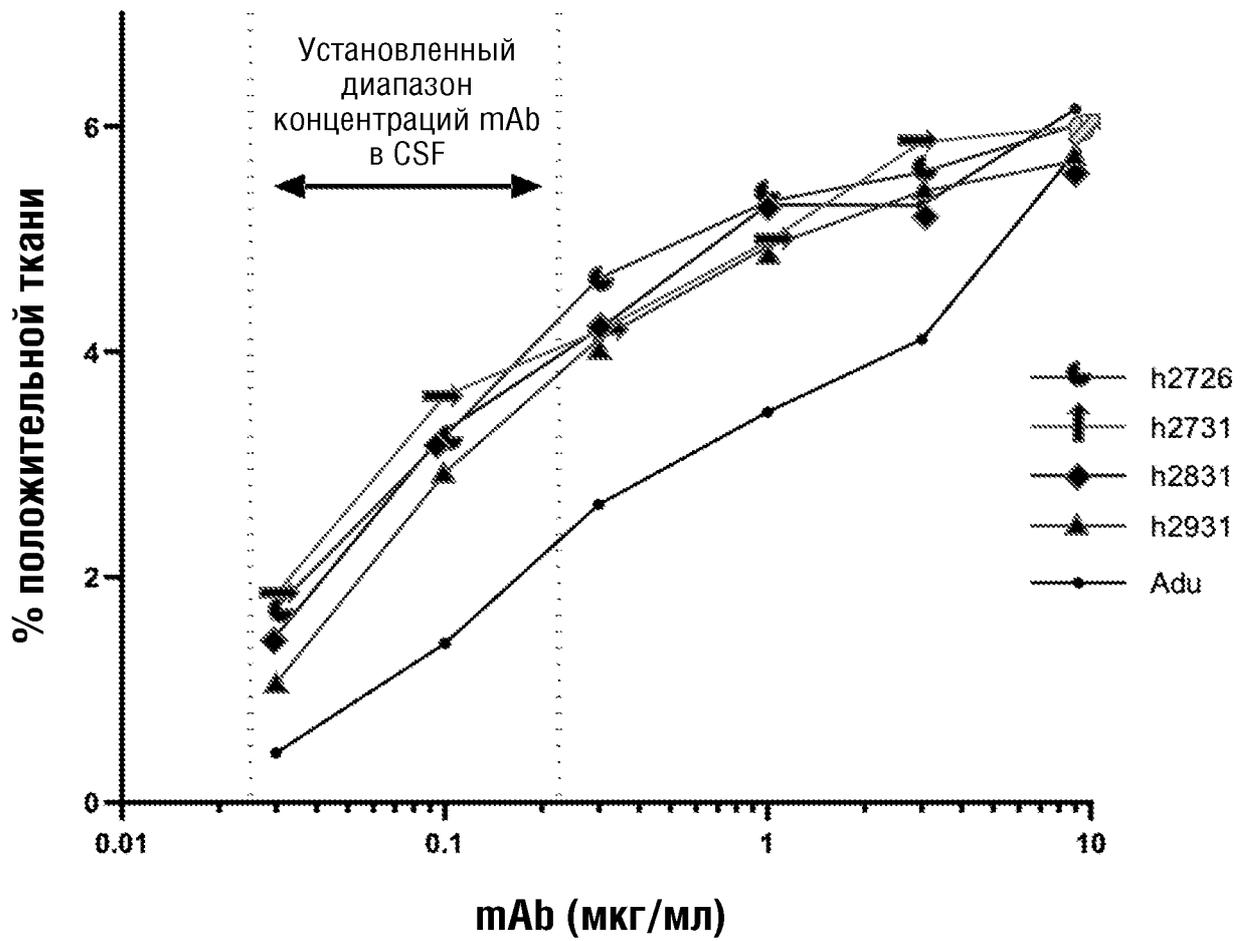
ФИГ.20В



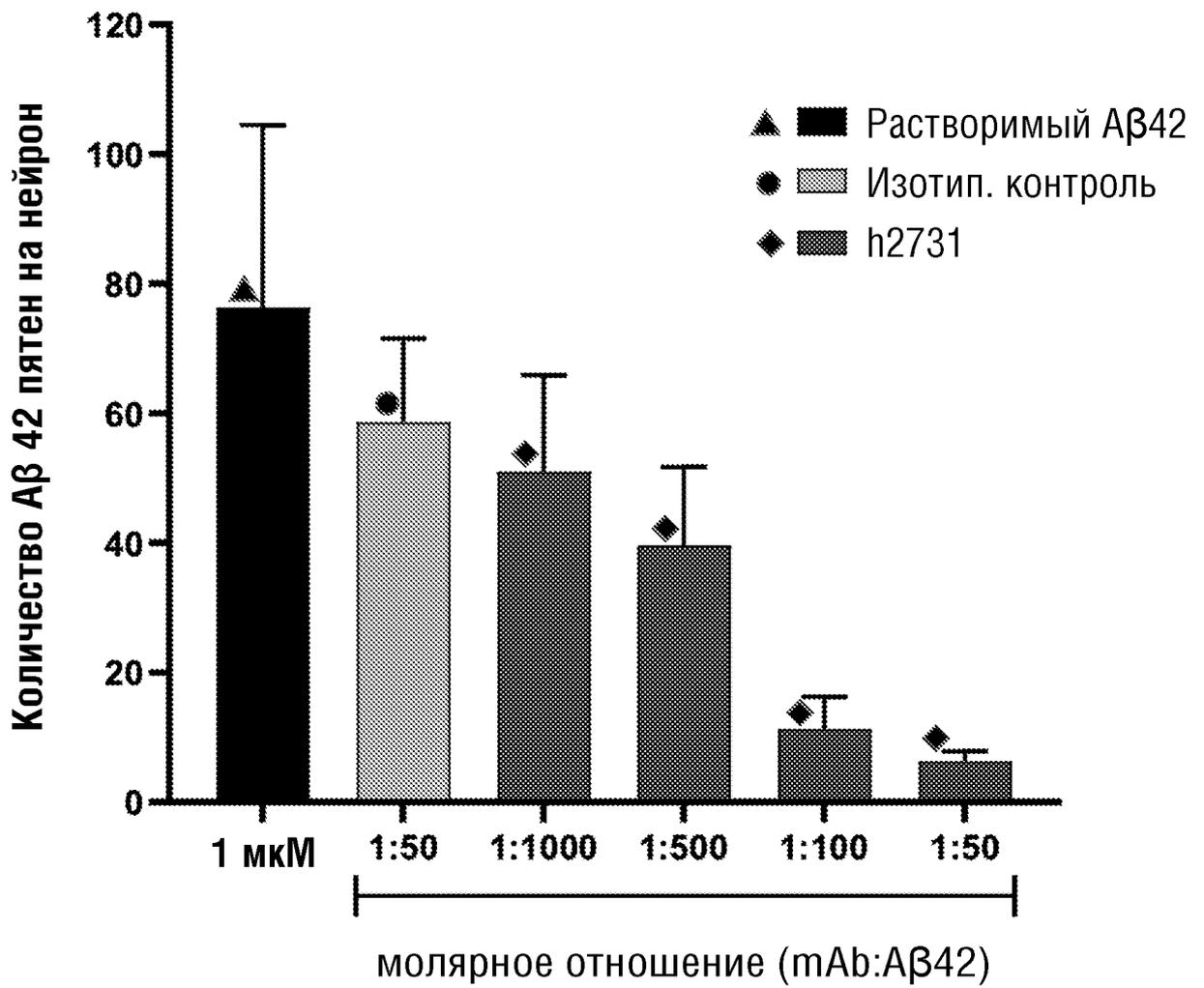
ФИГ.21



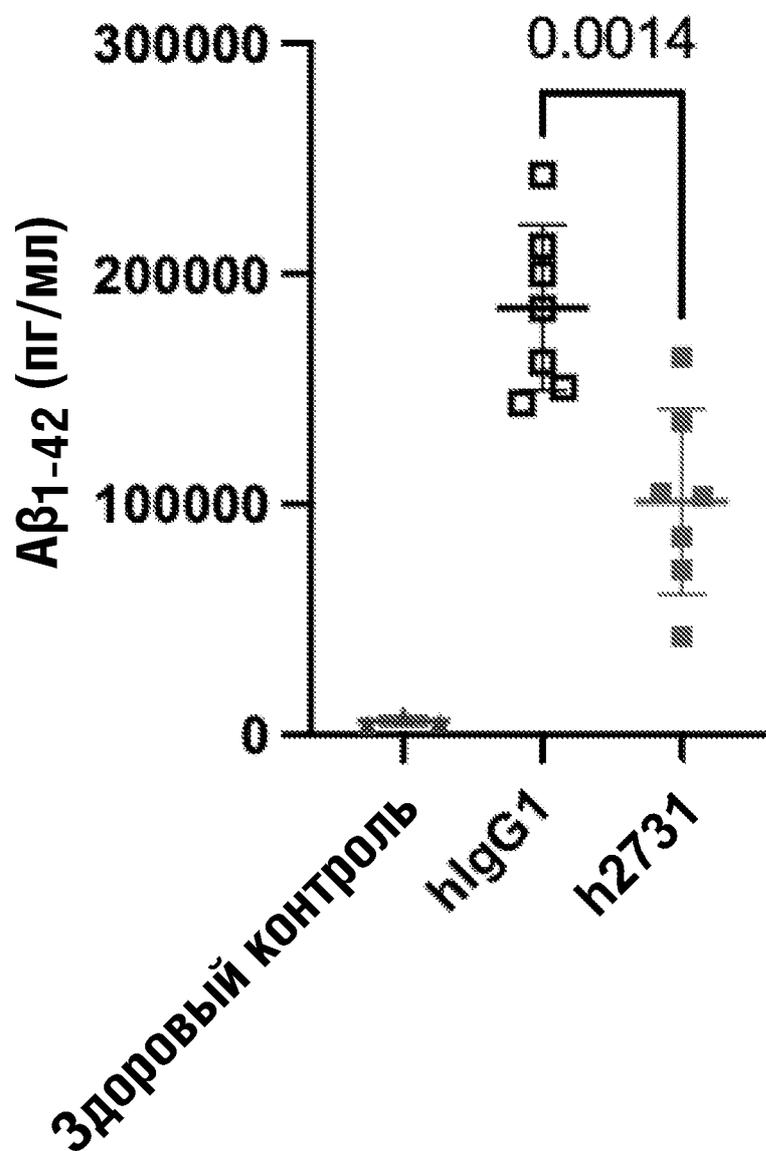
ФИГ.22



ФИГ.23

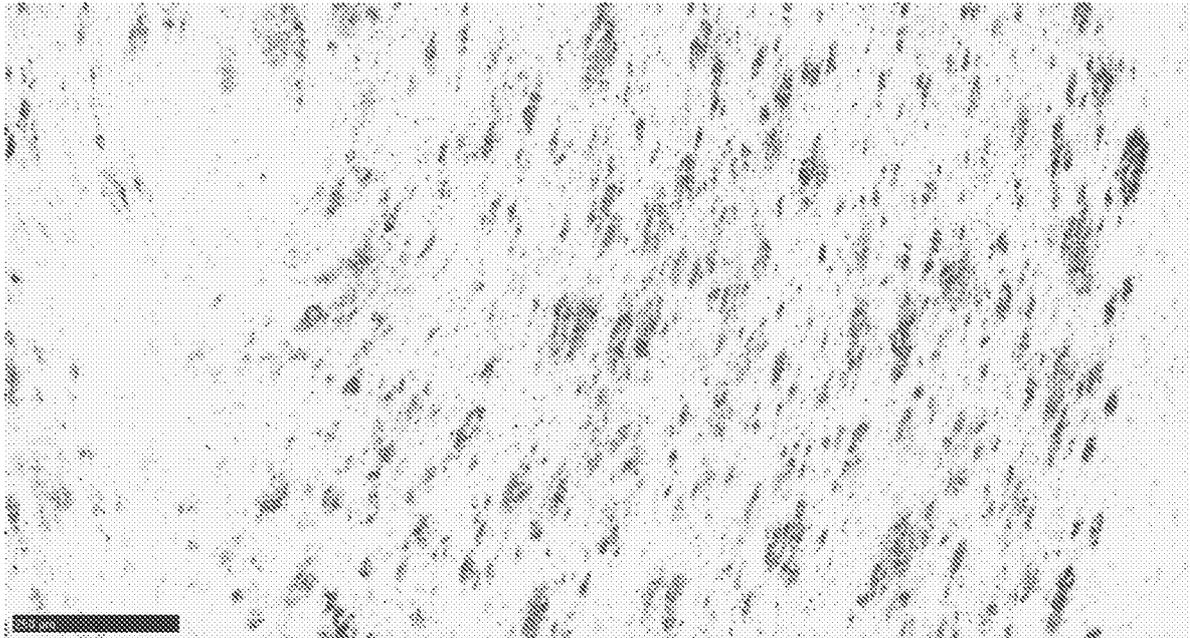


ФИГ.24



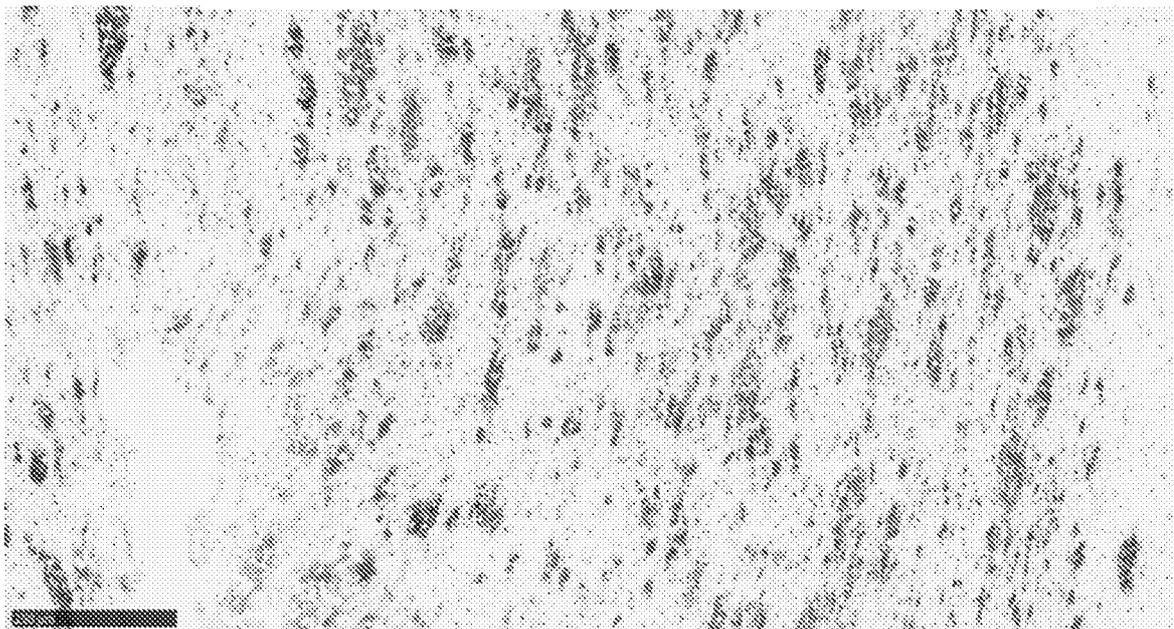
ФИГ.25А

Анти-пиро-Glu (Ab822301) (10 мкг/мл)

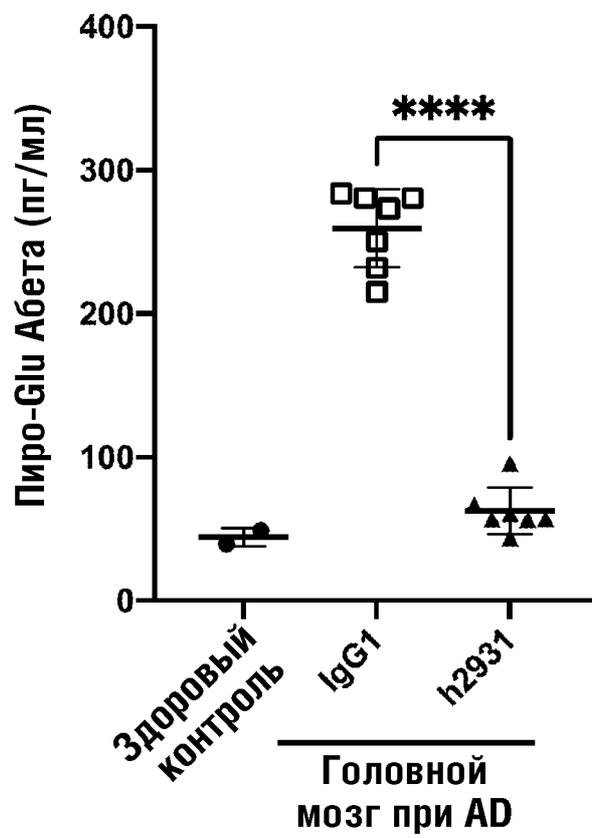


ФИГ.25В

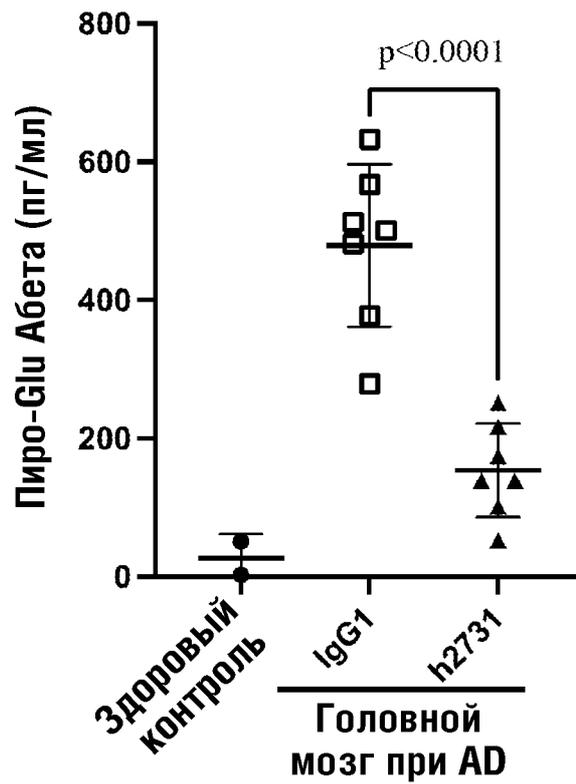
H2931 (1 мкг/мл)



ФИГ.26А

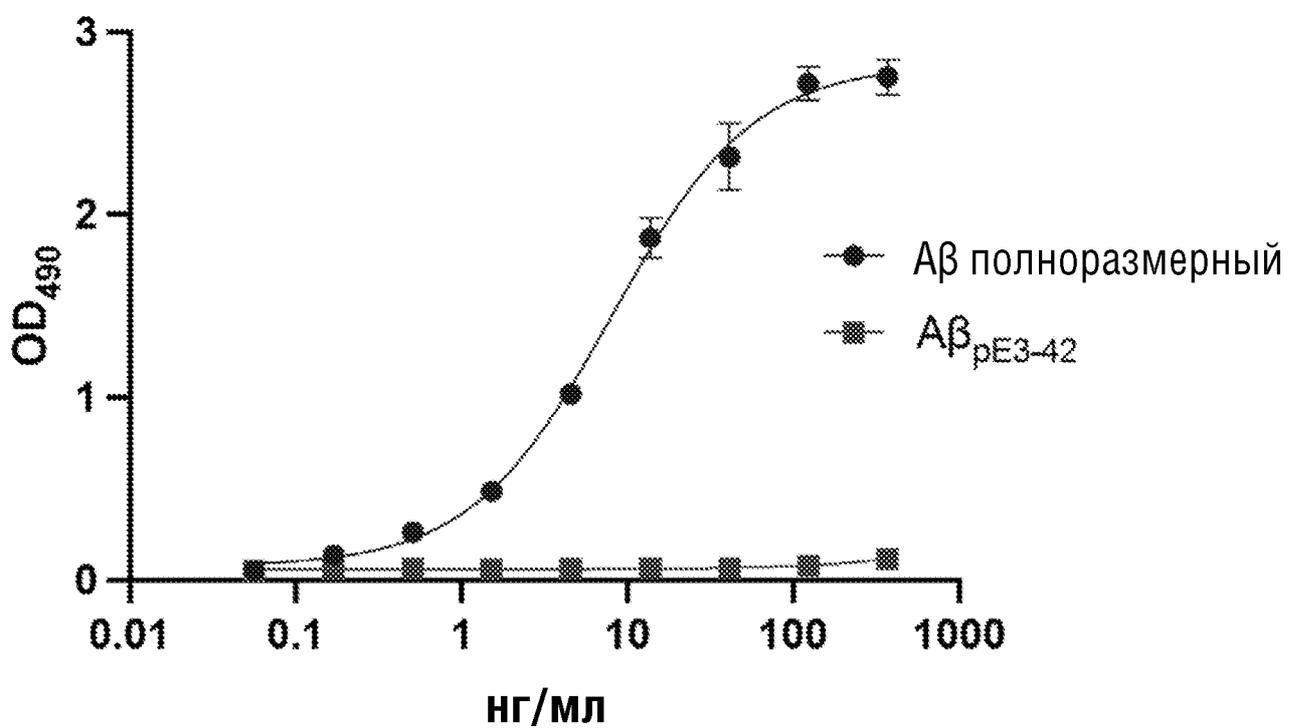


ФИГ.26В



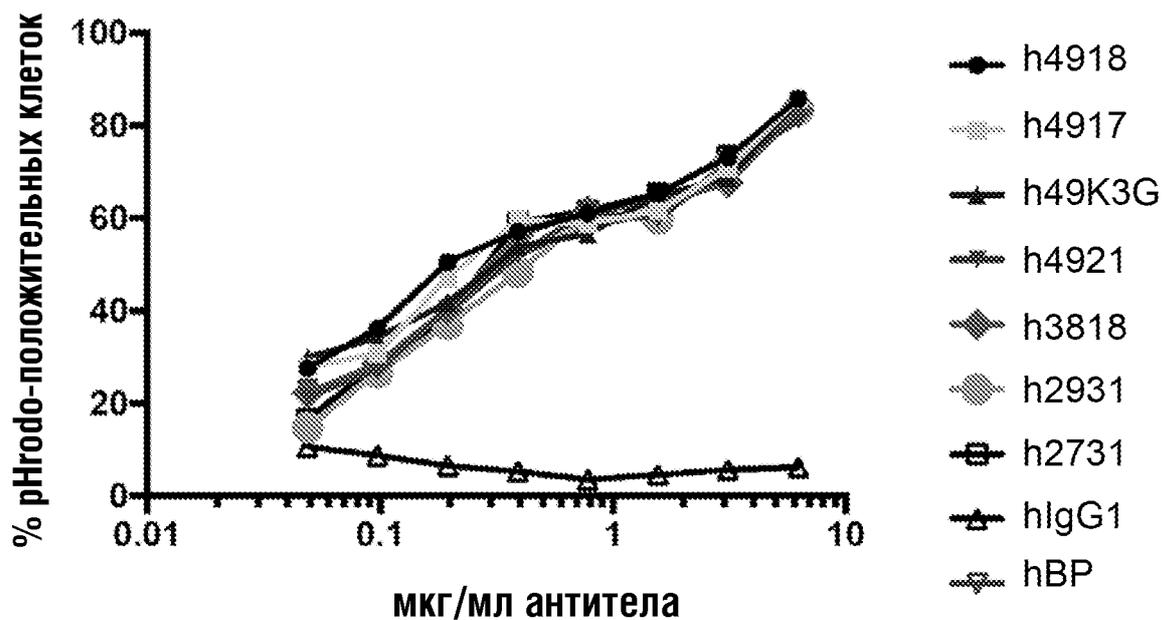
ФИГ.27

h2731 связывается с N-концом $A\beta_{1-42}$, но не $A\beta_{pE3-42}$



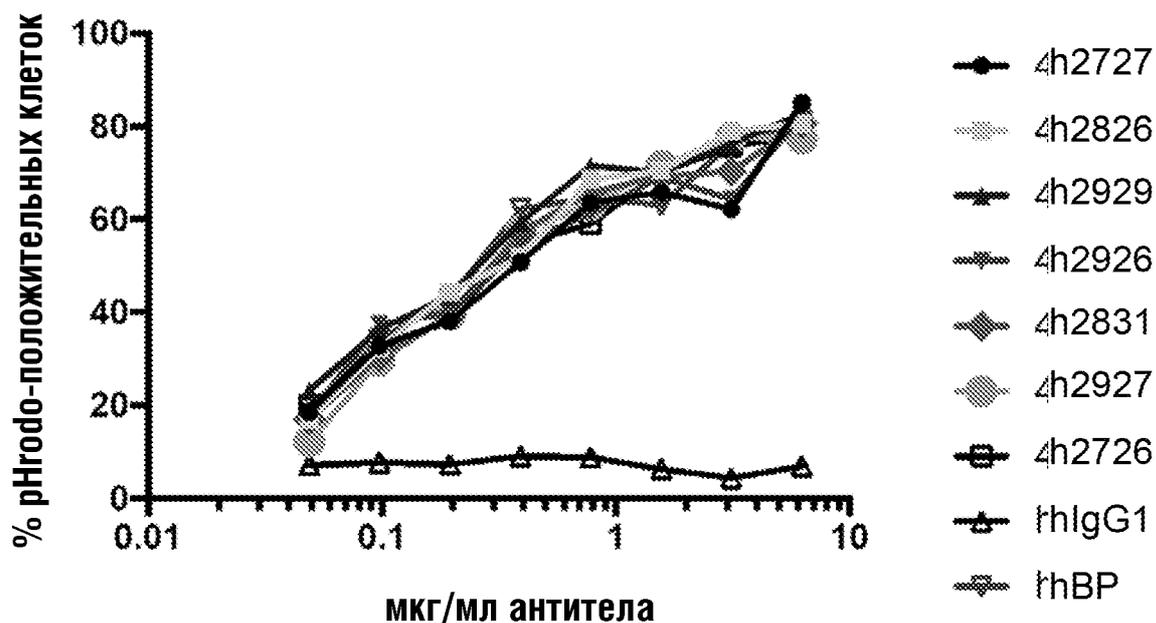
ФИГ.28А

Анти-А β антитела индуцируют фагоцитоз А β ₁₋₄₂ протофибрилл в THP-1 моноцитах человека *in vitro*

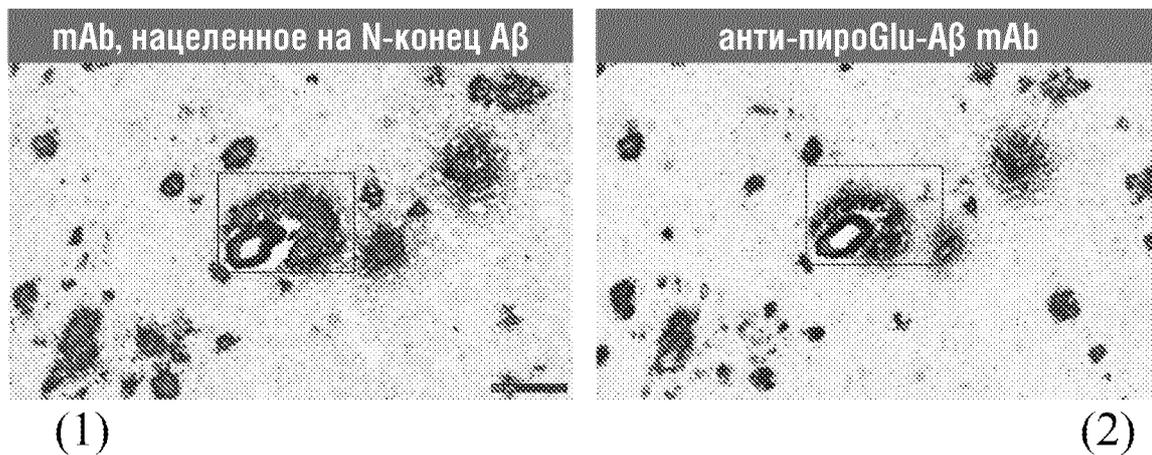


ФИГ.28В

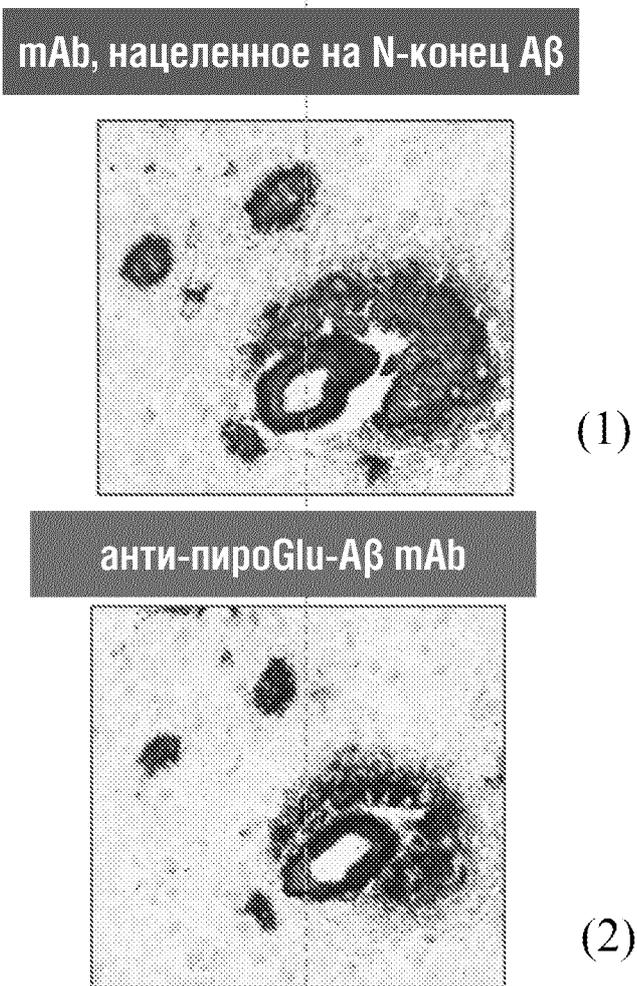
Анти-А β антитела индуцируют фагоцитоз А β ₁₋₄₂ протофибрилл в THP-1 моноцитах человека *in vitro*



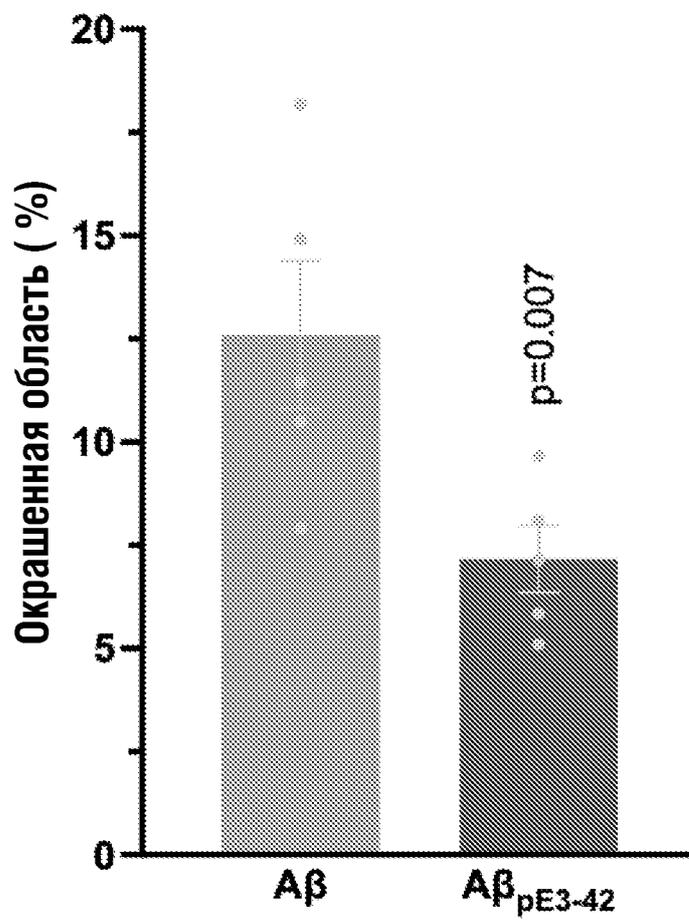
ФИГ.29А



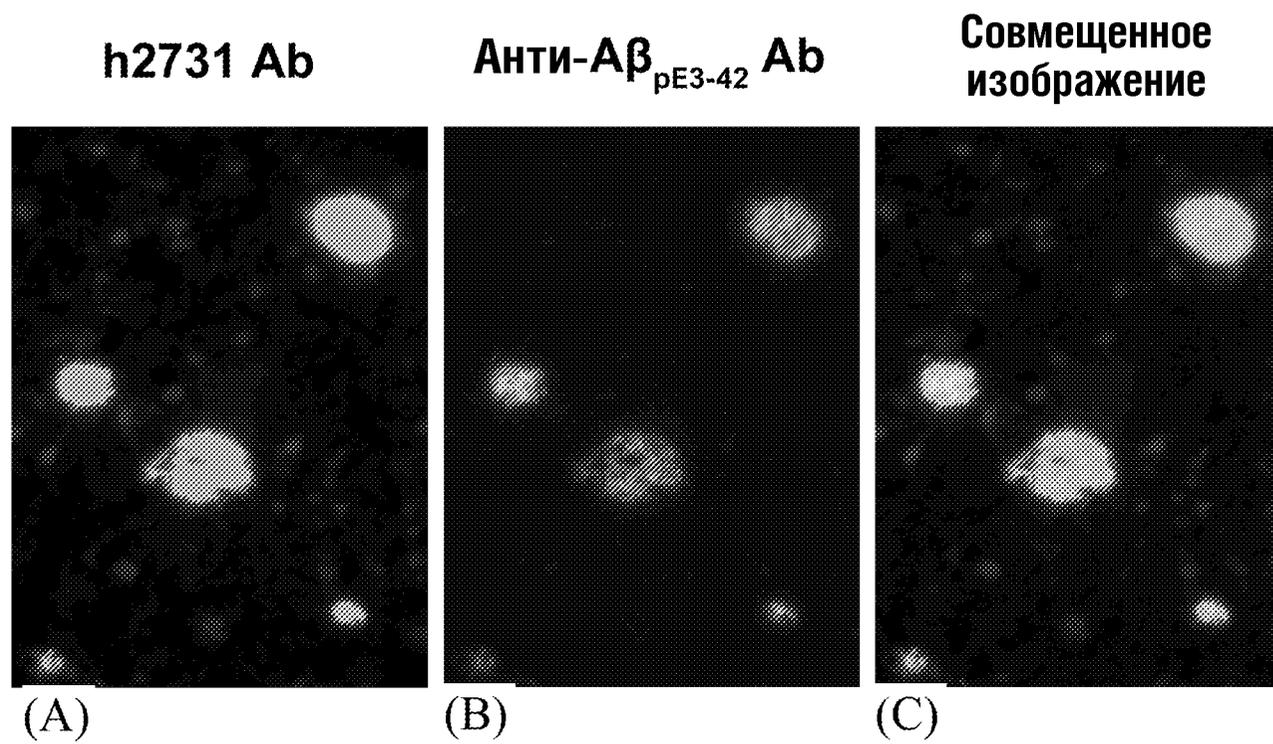
ФИГ.29В



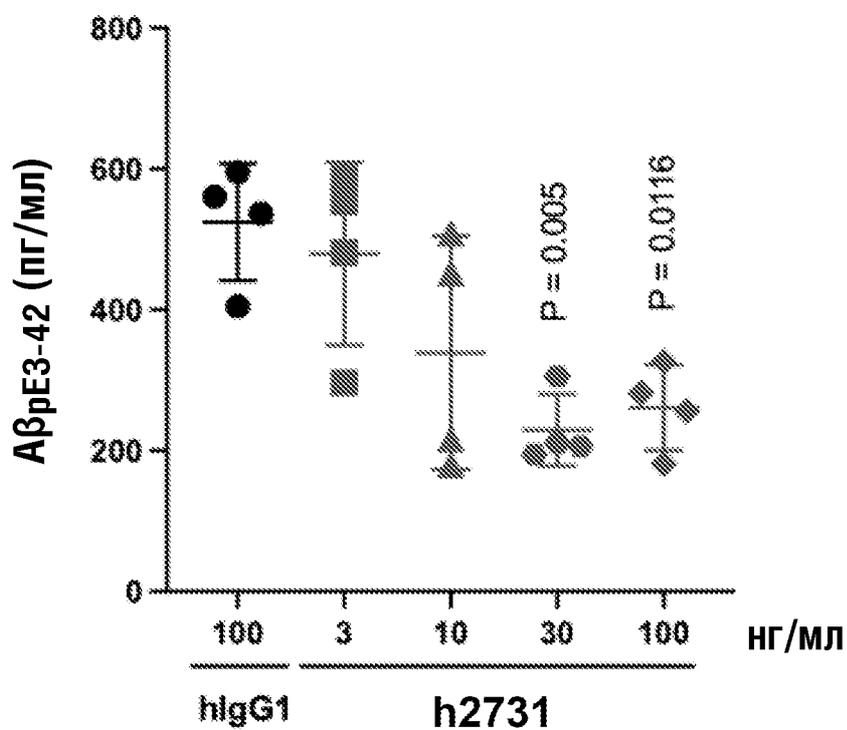
ФИГ.29С



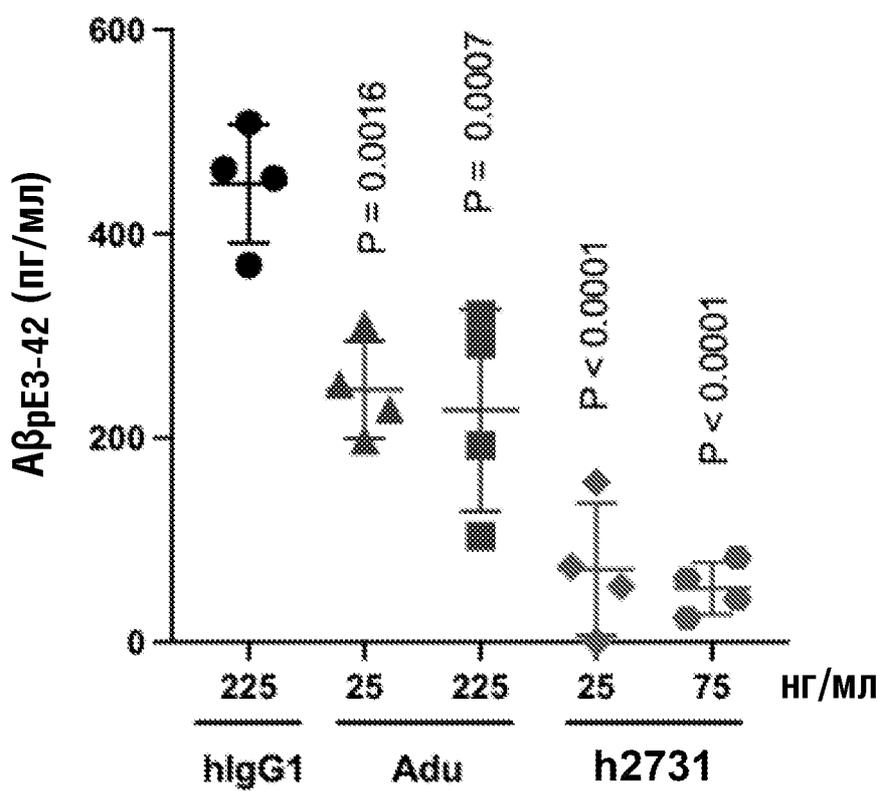
ФИГ.30



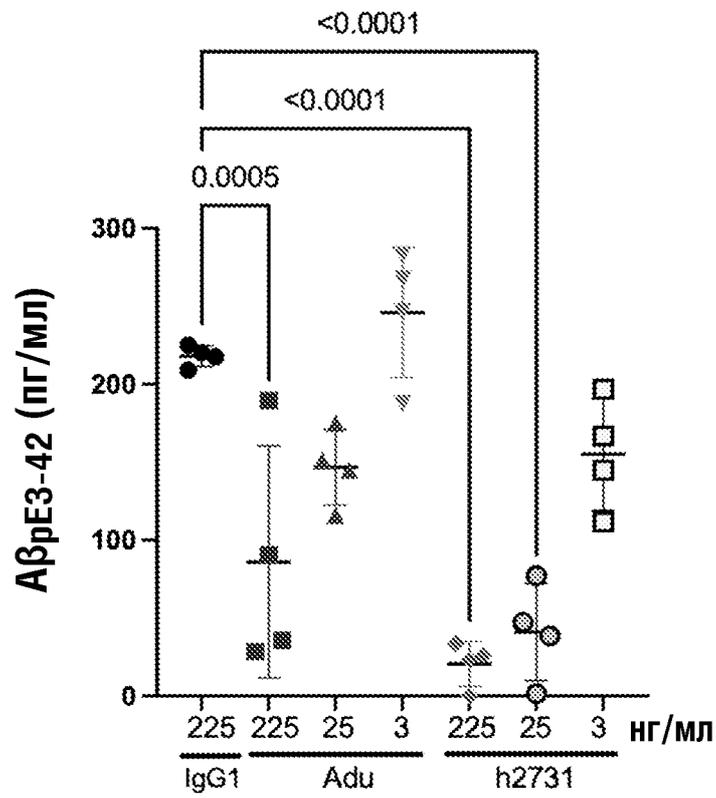
ФИГ.31А



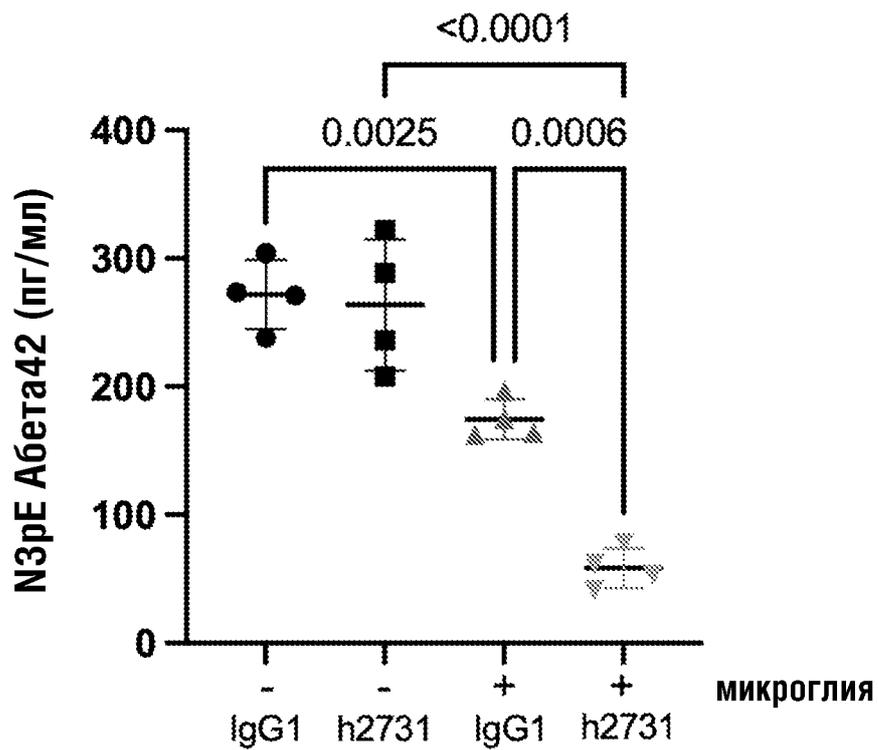
ФИГ.31В



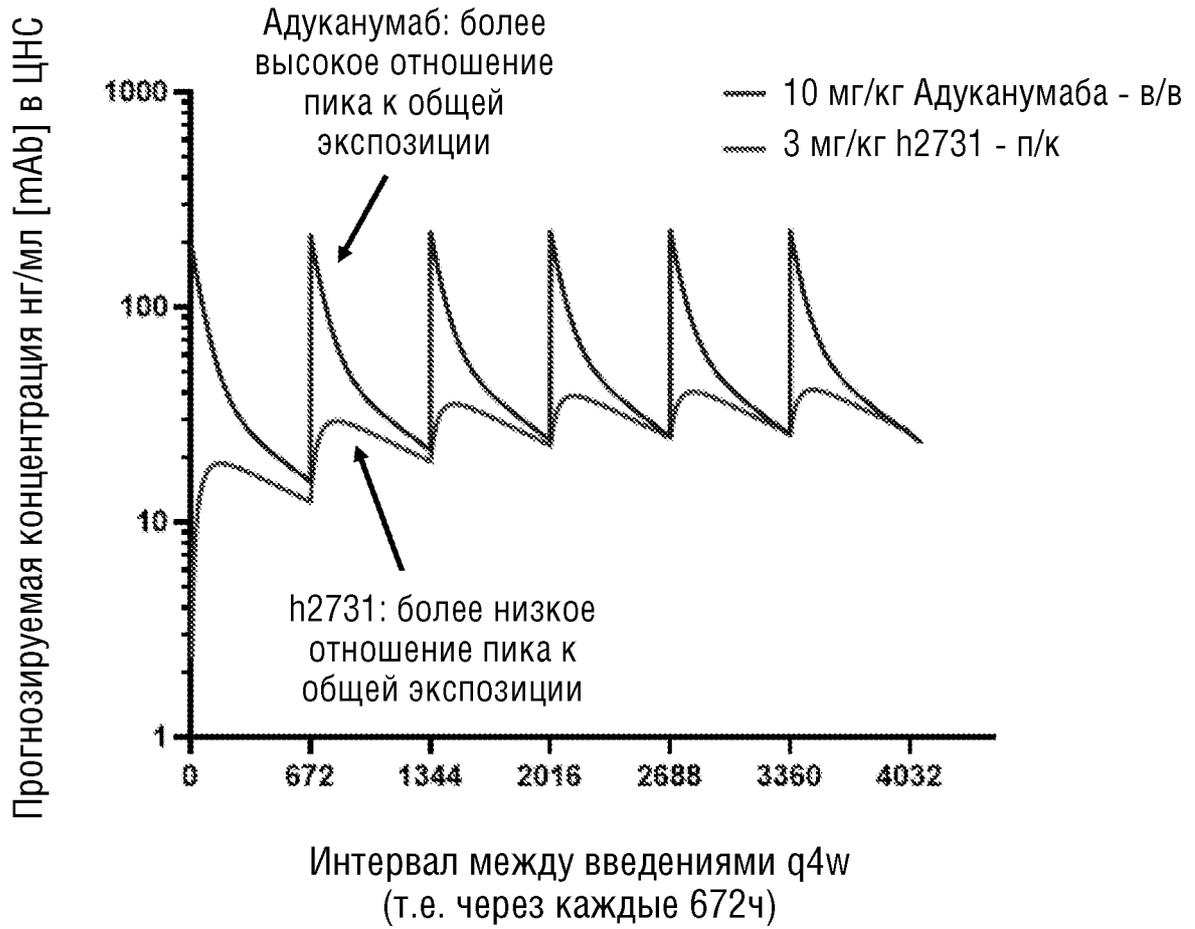
ФИГ.32А



ФИГ.32В



ФИГ.33



ФИГ.34

