



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008128139/10, 08.12.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.12.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

12.12.2005 EP 05027092.5;

14.07.2006 EP 06014729.5;

02.10.2006 EP 06020766.9

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2010 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 27.05.2015 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2003/108551 A1, 12.06.2003. WO 01/18169 A2, 15.03.2001. RU 2005/114355 A, 10.12.2005. SOLOMON B. et al., "Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide." Proc Natl Acad Sci USA (1996); 93(1):452-455

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 14.07.2008

(86) Заявка РСТ:
EP 2006/011862 (08.12.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/068412 (21.06.2007)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма "Городиский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

Рут ГРЕФЕРАТ (DE),
Дейвид ХИКМАН (CH),
Андреас МУС (CH),
Андреа ПФАЙФЕР (CH),
Клод НИКОЛО (US)

(73) Патентообладатель(и):

АЦ ИММУНЕ СА (CH)

(54) СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ АМИЛОИДА БЕТА (А БЕТА) 1-42 МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии. Предложена гибридная клеточная линия FP12H3-C2, депонированная под номером DSM ACC2750, продуцирующая антитело против бета-амилоида. Рассмотрены способы получения антитела, в том числе гуманизированного антитела, с использованием гибридной линии по

изобретению, а также способы диагностики ассоциированного с бета-амилоидом заболевания или нарушения у пациента или предрасположенности к такому заболеванию или нарушению, способ определения степени поражения ткани амилоидогенными бляшками, способ мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента после лечения

антителом или его активным фрагментом, способ прогнозирования чувствительности пациента, получающего лечение антителом или его активным фрагментом. Настоящее изобретение может найти дальнейшее применение в

диагностике и терапии связанных с бета-амилоидом болезней, таких как болезнь Альцгеймера. 8 н. и 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 5 табл., 17 пр.

R U 2 5 5 1 7 8 2 C 2

R U 2 5 5 1 7 8 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 551 782**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2008128139/10, 08.12.2006

(24) Effective date for property rights:
08.12.2006

Priority:

(30) Convention priority:

12.12.2005 EP 05027092.5;

14.07.2006 EP 06014729.5;

02.10.2006 EP 06020766.9

(43) Application published: 20.01.2010 Bull. № 2

(45) Date of publication: 27.05.2015 Bull. № 15

(85) Commencement of national phase: 14.07.2008

(86) PCT application:

EP 2006/011862 (08.12.2006)

(87) PCT publication:

WO 2007/068412 (21.06.2007)

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

Rut GREFERAT (DE),
Dejvid KHIKMAN (CH),
Andreas MUS (CH),
Andrea PFAJFER (CH),
Klod NIKOLO (US)

(73) Proprietor(s):

ATs IMMUNE SA (CH)

(54) ANTI-AMYLOID BETA (A BETA) 1-42 MONOCLONAL ANTIBODIES POSSESSING THERAPEUTIC PROPERTIES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention refers to biotechnology and immunology. What is presented is a hybridoma cell line FP12H3-C2 deposited under No. DSM ACC2750 producing the anti-beta-amyloid antibody. Presented are methods for preparing an antibody, including a humanised antibody with using a hybridoma line according to the invention, as well as diagnostic techniques for a beta-amyloid associated disease or condition in a patient or a liability to such disease or condition, a method for determining a degree

of the tissue involvement into amyloidogenic plaques, a method for monitoring minimal residual signs of the disease into a patient following treating with the antibody or its active fragment, a method for prediction of sensitivity in the patient treated with the antibody or its active fragment.

EFFECT: present invention can find further application in diagnosing and therapy of beta-amyloid related diseases, such as Alzheimer disease.

9 cl, 4 dwg, 5 tbl, 17 ex

Настоящее изобретение относится к способам и композициям, предназначенным для терапевтического и диагностического применения при лечении заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу нарушений и патологий, ассоциированных с амилоидным белком, таких как болезнь Альцгеймера.

Амилоидоз представляет собой не отдельное заболевание, а скорее группу разнообразных прогрессирующих болезненных процессов, которые характеризуются внеклеточными отложениями в ткани воскообразного крахмалоподобного белка, называемого амилоидом, который накапливается в одном или нескольких органах или системах организма. После образования амилоидных отложений они начинают препятствовать нормальному функционированию органа или системы организма. Существует по меньшей мере 15 различных типов амилоидоза. Основными формами являются первичный амилоидоз, не имеющий известных предвестников (состояний-предшественников) заболевания, вторичный амилоидоз, возникающий после определенного другого состояния, и наследственный амилоидоз.

Вторичный амилоидоз возникает у людей, страдающих хроническим инфекционным или воспалительным заболеванием, таким как туберкулез, бактериальная инфекция, которую называют семейной средиземноморской лихорадкой, костными инфекционными заболеваниями (остеомиелит), ревматоидный артрит, воспаление тонкого кишечника (гранулематозный илеит), болезнь Ходжкина и проказа.

Амилоидные отложения, как правило, включают три компонента. Амилоидные белковые фибриллы, на долю которых приходится примерно 90% амилоидного материала, состоят из одного или нескольких различных типов белков. Фибриллы этих белков обладают способностью принимать так называемую «бета-складчатую конформацию», представляющую собой уникальную конфигурацию белка, которая обладает сайтами связывания с красителем конго красным, что обуславливает уникальную способность амилоидного белка к окрашиванию. Кроме того, амилоидные отложения тесно ассоциированы с компонентом, представляющим собой амилоид Р (пентагональный) (АР), гликопротеин, родственный обычному сывороточному амилоиду Р (амилоидному белку) (SAP), и сульфатированными гликозаминогликанами (GAG), сложными углеводами, присутствующими в соединительной ткани.

Многие связанные с возрастом заболевания обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками и характеризуются, в частности, образованием внеклеточных отложений амилоида или амилоидоподобного материала, которые участвуют в патогенезе, а также в развитии заболевания. Такие заболевания включают (но не ограничиваясь ими) неврологические нарушения, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона. Другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, представляют собой прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Хотя патогенез этих заболеваний может быть различным, характерные для них

отложения часто содержат многие сходные молекулярные компоненты. В значительной степени это может относиться к местной активации провоспалительных путей, приводя тем самым к конкурентному отложению компонентов активированного комплемента, реактантов острой фазы, иммуномодуляторов и других воспалительных медиаторов

(McGeer и др., 1994).
Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой неврологическое нарушение, которое, как предполагается, вызывается прежде всего амилоидными бляшками, накоплением патологических отложений белков в головном мозге. Наиболее часто встречающийся тип амилоида, выявленный в головном мозге пораженных заболеванием индивидуумов, в основном состоит из Аβ-фибрилл. Научно доказано, что увеличение производства и накопления бета-амилоидного белка в бляшках приводит к гибели нервных клеток, что способствует возникновению и развитию болезни Альцгеймера. В свою очередь, утрата нервных клеток в стратегически важных областях головного мозга приводит к уменьшению уровня нейромедиаторов и ухудшению памяти. К белкам, которые в первую очередь ответственны за образование бляшки, относятся амилоидный белок-предшественник (APP) и два пресенилина (пресенилин I и пресенилин II).

Последовательное расщепление амилоидного белка-предшественника (APP), который конститутивно экспрессируется и катаболизируется в большинстве клеток, ферментами β- и γ-секретазами приводит к высвобождению состоящего из 39-43 аминокислот Аβ-пептида. Расщепление APP, по-видимому, приводит к повышению их способности к агрегации с образованием бляшек. Аβ(1-42)-фрагмент обладает прежде всего наиболее высокой способностью образовывать агрегаты благодаря наличию двух высокогидрофобных аминокислотных остатков на его С-конце. Поэтому предполагается, что прежде всего Аβ(1-42)-фрагмент участвует и ответственен за инициацию образования нейритной бляшки при болезни Альцгеймера и, следовательно, обладает высоким патологическим потенциалом. Таким образом, существует необходимость в создании специфических антител, которые могут направленно воздействовать на образование амилоидных бляшек и разрушать их.

Симптомы AD проявляются медленно, и первым симптомом может быть лишь слабая забывчивость. На этой стадии индивидуумы могут забывать последние события, действия, имена знакомых людей или названия вещей и могут быть не в состоянии решить простые математические задачи. По мере прогрессирования болезни симптомы становятся более заметными и настолько серьезными, что вынуждают людей, пораженных AD, или членов их семьи прибегать к медицинской помощи. Симптомы, характерные для средней стадии AD, включают забывание того, как выполнять простые функции, такие как приводить себя в порядок, при этом возникают проблемы с речью, пониманием, чтением или письмом. Пациенты на поздней стадии AD могут становиться боязливыми или агрессивными, могут уходить далеко от дома и, в конце концов, нуждаться в полном уходе.

В настоящее время единственным надежным путем диагностики AD является идентификация бляшек и сплетений в ткани головного мозга при вскрытии после смерти индивидуума. Таким образом, пока индивидуум еще жив, доктора могут ставить только диагноз «возможна» или «вероятна» AD. С помощью современных методов лечащие врачи могут правильно диагностировать вплоть до 90 процентов случаев AD с помощью ряда средств, позволяющих диагностировать «возможную» AD. Лечащие врачи задают вопросы об общем состоянии здоровья индивидуума, медицинских проблемах, имевших место в прошлом, и истории каких-либо затруднений у индивидуума при выполнении повседневных действий. Поведенческие тесты на память, решение задач, внимание,

счет и речь позволяют получать информацию о когнитивной дегенерации, а медицинские анализы, такие как анализы крови, мочи или спинномозговой жидкости, и сканирование головного мозга могут дать некоторую дополнительную информацию.

Борьба с AD заключается в осуществлении лечения, основанного на применении лекарственных средств, и лечения без использования лекарственных средств (немедикаментозного лечения). Лечение с целью изменения основного течения болезни (замедления или реверсирования развития) до сих пор были по большей части безуспешными. Было продемонстрировано, что лекарственные средства, которые восстанавливают дефицит (дефект) или недостаточную функцию химических медиаторов нервных клеток (нейромедиаторов), в частности ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин и ривастигмин, позволяют улучшать симптомы. ChEI задерживают ферментативное расщепление нейромедиаторов, повышая тем самым количество химических медиаторов, пригодных для передачи нервных сигналов в головном мозге.

Для некоторых людей на ранней и средней стадиях заболевания такие лекарственные средства, как такрин (COGNEX®, Моррис-Плейнс, шт.Нью-Джерси), донепезил (ARICEPT®, Токио, Япония), ривастигмин (EXELON®, Ист-Хановер, шт.Нью-Джерси) или галантамин (REMINYL®, Нью-Брансуик, шт.Нью-Джерси), могут предупреждать ухудшение некоторых симптомов в течение ограниченного периода времени. Другое лекарственное средство, мемантин (NAMENDA®, Нью-Йорк, шт.Нью-Йорк), разрешено для лечения AD от средней до тяжелой степени. Лекарственные средства могут воздействовать также на психиатрические проявления AD. Некоторые лекарственные средства могут помогать также контролировать поведенческие симптомы AD, такие как бессонница, возбуждение, блуждание, тревога и депрессия. Лечение этих симптомов часто делает жизнь пациентов более комфортной и облегчает обслуживающему персоналу уход за ними. К сожалению, несмотря на значительные успехи лечения, демонстрирующие, что этот класс агентов существенно превосходит по эффективности плацебо, болезнь продолжает прогрессировать, а влияние на умственные функции в среднем является очень ограниченным. Многие лекарственные средства, применяемые для лечения AD, такие, например, как ChEI, обладают также побочными действиями, которые включают желудочно-кишечные нарушения, токсичность для печени и потерю веса.

К другим заболеваниям, которые обусловлены или ассоциированы с накоплением и отложением амилоидоподобного белка, относятся умеренное когнитивное нарушение, деменция, связанная с тельцами Леви (LBD), амиотрофический боковой склероз (ALS), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), и дегенерация желтого пятна, прежде всего связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD).

Умеренное когнитивное нарушение (MCI) является общим понятием, которое включает наиболее часто встречающиеся небольшие, но заметные нарушения памяти. Индивидуум, страдающий MCI, испытывает больше затруднений, связанных с памятью, чем это можно ожидать в связи с возрастом, однако не имеет других симптомов деменции, таких как нарушение рассудительности и логического хода мысли. MCI представляет собой состояние, которое часто является свидетельством преклинической стадии AD.

Отложение β -амилоида в энторинальной области коры головного мозга (EC), по-видимому, играет основную роль в развитии умеренного когнитивного нарушения (MCI) в престарелом возрасте. Это согласуется с данными о том, что уровни $A\beta(1-42)$ в CSF (спинномозговая жидкость)-А существенно снижаются, когда клинические признаки AD становятся явными. В отличие от CSF-A, уровни $A\beta(1-42)$ в CSF-тау

существенно повышаются на стадии MCI, и эти уровни продолжают оставаться повышенными в дальнейшем, это свидетельствует о том, что повышенные уровни в CSF-тау можно использовать для обнаружения индивидуумов, страдающих MCI, которые предрасположены к развитию AD.

5 Деменция, связанная с тельцами Леви (LBD), представляет собой нейродегенеративное нарушение, которое может возникать у индивидуумов старше 65 лет, как правило, вызывающее симптомы когнитивного (мыслительного) нарушения и патологические изменения поведения. Симптомы могут включать когнитивное нарушение, неврологические признаки, нарушение сна и неспособность к самостоятельным
10 действиям. Когнитивное нарушение в большинстве случаев является характерной особенностью LBD. У пациентов происходят повторяющиеся случаи замешательства, которые прогрессивно усугубляются. Флуктуации когнитивной способности часто ассоциированы со сдвигом уровня внимания и бдительности. Когнитивное нарушение и флуктуации мыслительной способности могут варьироваться в течение минут, часов
15 или дней.

Тельца Леви образуются из фосфорилированных и нефосфорилированных нейрофиламентных белков; они содержат синаптический белок альфа-синуклеин, а также убикитин, который участвует в элиминации поврежденных или аномальных белков. Помимо телец Леви могут присутствовать также нейриты Леви, представляющие
20 собой тельца включения, участвующие в клеточных процессах в нервных клетках. Амилоидные бляшки могут образовываться в головном мозге пациентов, пораженных LBD, однако, как правило, в меньшем количестве, чем у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. Наличие нейрофибриллярных сплетений, представляющих собой еще один микропатологический признак AD, не является главной отличительной
25 особенностью LBD, но они часто присутствуют в дополнение к амилоидным бляшкам.

Амиотрофический боковой склероз (ALS) характеризуется дегенерацией верхних и нижних двигательных нейронов. У некоторых пациентов с ALS может иметь место деменция или афазия (ALS-D). Деменция наиболее часто представляет собой лобно-височную деменцию (FTD), и во многих таких случаях имеются убикитин-
30 положительные, тау-отрицательные включения в нейронах зубчатой извилины медиальной и нижней поверхности полушария головного мозга и поверхностных слоях лобной и височной долей головного мозга.

Миозит, связанный с тельцами включения (IBM), представляет собой калечащее заболевание, как правило, обнаруживаемое у людей старше 50 лет, при котором
35 возникает воспаление мышечных волокон, и они начинают атрофироваться, но при этом головной мозг не нарушается, и пациенты полностью сохраняют свой интеллект. Обнаружено, что уровень двух ферментов, участвующих в производстве белка амилоида- β , повышен в мышечных клетках пациентов, страдающих этим часто встречающимся у пожилых людей прогрессирующим мышечным заболеванием, при этом повышается
40 также уровень амилоида- β .

Еще одним заболеванием, обусловленным или ассоциированным с накоплением и отложением амилоидоподобного белка, является дегенерация желтого пятна.

Дегенерация желтого пятна представляет собой обычное заболевание глаза, которое вызывает деградацию желтого пятна, т.е. центральной области сетчатки (тонкий слой
45 ткани на задней части глаза, откуда светочувствительные клетки посылают зрительные сигналы в головной мозг). Желтое пятно опосредует острое, четкое, «неискаженное» зрение. Повреждение желтого пятна приводит к развитию слепых пятен и затуманенному или нарушенному зрению. Связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD)

является основной причиной ухудшения зрения в Соединенных Штатах, и у людей старше 65 лет она представляет собой основную причину медицински подтвержденной слепоты среди лиц кавказской расы. Примерно 1,8 миллионов американцев в возрасте 40 лет и старше имеют развитую AMD, а еще у 7,3 миллионов людей с умеренной AMD

5 имеется значительный риск потери зрения. По оценкам правительства к 2020 г. 2,9 миллиона людей будут иметь развитую AMD. Жертвы AMD часто бывают удивлены и расстроены, когда узнают, как мало известно о причинах и методах лечения этого состояния слепоты.

Существует две формы дегенерации желтого пятна: сухая дегенерация желтого пятна

10 и влажная дегенерация желтого пятна. Сухая форма, при которой клетки желтого пятна медленно начинают разрушаться, диагностирована в 85 процентах случаев дегенерации желтого пятна. Как правило, сухая AMD поражает оба глаза, хотя при этом один глаз может потерять зрение, а второй глаз оставаться непораженным. Обычно ранними признаками сухой AMD являются друзы, которые представляют собой отложения

15 желтого тела под сетчаткой. Риск возникновения развитой сухой AMD или влажной AMD повышается с увеличением количества или размера друз. Сухая AMD может прогрессировать и вызывать потерю зрения, не превращаясь во влажную форму заболевания; однако на ранней стадии сухая AMD может внезапно переходить во влажную форму.

20 Хотя на долю влажной формы приходится только 15 процентов случаев, она в 90 процентах приводит к слепоте, и ее рассматривают как развитую AMD (не существует ранней или промежуточной стадии влажной AMD). Влажной AMD всегда предшествует сухая форма заболевания. При прогрессировании сухой формы у некоторых людей начинается патологический рост кровеносных сосудов позади желтого пятна. Эти

25 сосуды являются очень хрупкими и из них просачивается жидкость и кровь (отсюда название «влажная» дегенерация желтого пятна), приводя к быстрому повреждению желтого пятна.

Сухая форма AMD первоначально часто вызывает слегка затуманенное зрение. Затем прежде всего центральная часть зрительного поля может становиться

30 затуманенной, и эта область увеличивается в размерах по мере прогрессирования заболевания. Если поражен только один глаз, то симптомы могут оставаться незамеченными. В случае влажной AMD прямые линии могут представляться волнистыми, и при этом может быстро наступать потеря центрального зрения.

Для установления диагноза дегенерации желтого пятна, как правило, проводят

35 исследование расширенного глаза (зрачка), тест на остроту зрения и обследование задней стенки глаза с использованием процедуры, называемой фундоскопией, помогающей установлению диагноза AMD, и, если имеется предположение о наличии влажной AMD, то может быть проведена ангиография с использованием флуоресцеина. В настоящее время отсутствуют средства лечения, позволяющие предупредить потерю

40 зрения, если сухая AMD достигла развитой стадии. Однако применение определенной композиции, содержащей высокую дозу антиоксидантов и цинка, может замедлять или предупреждать прогрессирование промежуточной стадии AMD, приводящее к переходу в развитую стадию. Macugen® (инъекция пегаптана натрия), лазерное фотокоагулирование и фотодинамическая терапия позволяют контролировать

45 патологический рост кровеносных сосудов и кровоизлияние в желтом пятне, что является полезным для определенной группы людей с влажной AMD; однако зрение, если оно уже почти потеряно, не может быть восстановлено с помощью таких методов. Если зрение почти потеряно, то существуют средства для слабого зрения, которые могут

помочь улучшить качество жизни.

Одним из самых ранних признаков связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD) является накопление внеклеточных отложений, известных как друзы, в области, находящейся между базальным слоем пигментированного эпителия сетчатки (RPE) и базальной оболочкой Бруха (BM). Результаты современных исследований, проведенных Anderson с соавторами, подтвердили, что друзы содержат амилоид-бета (Experimental Eye Research 78, 2004, сс.243-256).

В настоящее время проводятся исследования, в которых изучают факторы окружающей среды, генетические и связанные с питанием факторы, которые могут влиять на AMD. Исследуют также новые стратегии лечения, включая применение трансплантатов клеток сетчатки, лекарственных средств, которые должны предупреждать или замедлять прогрессирование заболевания, лучевой терапии, генной терапии, компьютерного чипа, имплантированного в сетчатку, который может стимулировать зрение, и агентов, которые должны предупреждать рост новых кровеносных сосудов под желтым пятном.

Важным фактором, который необходимо принимать во внимание при разработке новых лекарственных средств, является простота их применения пациентами, для которых они предназначены. На долю вводимых оральным путем лекарственных средств, в частности таблеток, капсул и мягких гелей, приходится 70% всех применяемых лекарственных форм из-за удобства их применения пациентами. Разработчики лекарственных средств признают, что пациенты предпочитают оральное применение по сравнению с инъекциями или другими более инвазивными формами, применяемыми в медицине. Также предпочтительными являются препаративные формы, которые позволяют снижать количество доз (т.е. формы, применяемые один раз в день, или формы с пролонгированным высвобождением). Простота применения антибиотиков в виде оральных лекарственных форм приводит к тому, что соблюдение пациентом режима и схемы лечения в процессе лечения улучшается.

Существует необходимость в создании эффективных методов и композиций для получения высокоспецифических и высокоэффективных антител, предпосылкой для создания которых является возможность применения антител в оральной лекарственной форме. Предпочтительно такие антитела должны распознавать специфические эпитопы на различных антигенах, таких как амилоидный белок.

Таким образом, необходима разработка эффективных композиций и методов, направленных на борьбу с осложнениями, ассоциированными с болезнями и нарушениями, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но, не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный

амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна. В частности, существует необходимость в разработке специализированных и высокоэффективных антител, которые позволяют противодействовать физиологическим проявлениям заболевания, таким как образование бляшек, ассоциированное с агрегацией волокон амилоида или амилоидоподобного пептида.

Было установлено, что антитела к амилоидам, которые вырабатываются при инокуляции A β 1-42, смешанным с полным или неполным адъювантом Фрейнда, обладают способностью снижать амилоидную нагрузку у трансгенных мышей, на которых смоделирована человеческая болезнь Альцгеймера (Schenk и др., 1999).

Внутрибрюшинная инокуляция тетрапальмитоилированного A β 1-16, реконструированного в липосомах, трансгенным мышам линии NORBA приводила к получению высоких титров антител к амилоидам, которые обладали также способностью солубилизовать амилоидные волокна и бляшки *in vitro* и *in vivo* (Nicolau и др., 2002).

Впервые гипотеза о возможном механизме, посредством которого происходит растворение амилоидных бляшек и волокон, была предложена Bard с соавторами, 2000, которые основывались на собственных результатах о том, что антитела опсонизируют бляшки, которые затем разрушаются макрофагами микроглии. De Mattos с соавторами, 2001, установили, что МАт к центральному домену β -амилоида обладало способностью связываться и полностью разрушать амилоид в плазме. Они доказали, что присутствие указанных МАт в кровотоке сдвигало равновесие A β между головным мозгом и плазмой в сторону периферического клиренса и катаболизма вместо накопления в головном мозге.

В настоящем изобретении предложены новые способы и композиции, содержащие высокоспецифические и высокоэффективные антитела, которые обладают способностью специфически распознавать и связываться со специфическими эпитопами, характерными для широкого разнообразия β -амилоидных антигенов. Согласно настоящему изобретению антитела особенно предпочтительно применять для лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, но не ограничиваясь ими.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены новые способы и композиции, предназначенные для сохранения или повышения когнитивной способности к запоминанию у млекопитающего, которое страдает ассоциированным с амилоидом заболеванием или состоянием, заключающиеся в том, что животному прежде всего

млекопитающему, более предпочтительно человеку, который нуждается в таком лечении, вводят в терапевтически эффективном количестве моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении.

Краткое описание чертежей и последовательностей

5 На чертежах показано:

на фиг.1 - пептиды, выведенные из последовательность A β 1-15, 1-16 и 1-16(Δ 14), 22-35 и 29-40;

на фиг.2 - данные о связывании моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 с видами амилоидов, полученные с помощью Вестерн-блоттинга и дот-блоттинга;

10 на фиг.3 - данные о связывании моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 с амилоидными волокнами, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа;

на фиг.4 - результаты параллельного эксперимента (эксперимента по типу «головка-к-голове»), включающего флуоресцентный анализ с использованием Th-T (тиофлавин-15 Т) и ЯМР-спектроскопию твердого тела меченного с помощью U¹³-C Tyr10 и Val12-пептида β -амилоида 1-42.

SEQ ID NO:1: Антигенный пептид A β ₁₋₁₅,

SEQ ID NO:2: Антигенный пептид A β ₁₋₁₆,

20 SEQ ID NO:3: Антигенный пептид A β _{1-16(Δ 14)},

SEQ ID NO:4: Антигенный пептид A β ₂₂₋₃₅,

SEQ ID NO:5: Антигенный пептид A β ₂₉₋₄₀,

SEQ ID NO:6: Антигенный пептид A β ₁₋₁₇,

25 SEQ ID NO:7: Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышиного C2,

SEQ ID NO:8: Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного C2,

30 SEQ ID NO:9: Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи мышиного C2,

SEQ ID NO:10: Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи мышиного C2, включая сигнальные последовательности,

SEQ ID NO:11: Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного C2,

35 SEQ ID NO:12: Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного C2, включая сигнальные последовательности,

SEQ ID NO:13-20: Аминокислотные последовательности вариантов эпитопной области A β -пептида,

SEQ ID NO:21: Аминокислотная последовательность легкой цепи мышиного C2,

40 SEQ ID NO:22: Аминокислотная последовательность тяжелой цепи мышиного C2.

Настоящее изобретение относится к применению презентации антигена, которая приводит к повышенной доступности и стабилизации предпочтительной конформации антигена и в конце концов к образованию антител с уникальными свойствами.

45 Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, или более предпочтительно моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, выработанное в ответ на обработку надмолекулярной антигенной конструкцией, которая содержит антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида,

прежде всего β -амилоидного пептида $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ и $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, модифицированного с помощью гидрофобного фрагмента, такого, например, как пальмитиновая кислота, или гидрофильного фрагмента, такого, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), или комбинации обоих указанных агентов, где гидрофобный и гидрофильный фрагмент
 5 соответственно связывают с помощью ковалентной связи с каждым концом антигенного пептида по меньшей мере через одну, прежде все одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин, глутаминовая кислота и цистеин или любая другая приемлемая аминокислота или аналог аминокислоты, который может служить в качестве
 10 соединяющего элемента для сшивания гидрофобного и гидрофильного фрагмента с пептидным фрагментом. Когда в качестве гидрофильного фрагмента применяют ПЭГ, то свободные концы ПЭГ ковалентно связывают с фосфатидилэтаноламином или любым другим соединением, которое может функционировать в качестве
 «заякоривающего» элемента, предназначенного для встраивания антигенной конструкции в бислой липосомы.

15 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое распознает нативную конформацию амилоида, в результате оно специфично связывается с амилоидными олигомерами и волокнами, но не связывается с линеаризованными видами амилоидов.

20 Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, предлагаемое в настоящем изобретении и описанное выше, где антитело или его фрагмент связывается с мономером $A\beta$, при этом
 25 аффинность к связыванию составляет от по меньшей мере примерно 1×10^{-6} до по меньшей мере примерно 1×10^{-8} , прежде всего от по меньшей мере примерно 1×10^{-6} до по меньшей мере примерно 1×10^{-7} , более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 1×10^{-8} , еще более предпочтительно от по меньшей
 30 мере примерно 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 4×10^{-7} , но предпочтительно не обладает никакой заметной перекрестной реактивностью с амилоидным белком-предшественником (APP).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело
 35 или его функциональные фрагменты, предлагаемое в настоящем изобретении и описанное выше, где антитело или его фрагмент связывается с волокном, фибриллой или филаментом $A\beta$, при этом аффинность к связыванию составляет от по меньшей мере примерно 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 1×10^{-9} , прежде всего от по меньшей
 40 мере примерно 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 1×10^{-8} , более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} до по меньшей мере примерно 1×10^{-9} , еще более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} до по меньшей мере примерно 5×10^{-8} , но предпочтительно не обладает никакой заметной перекрестной реактивностью
 45 с амилоидным белком-предшественником (APP).

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, предлагаемое в настоящем изобретении и описанное выше, аффинность к связыванию которого с волокном, фибриллой или

филаментом Аβ по меньшей мере в 5 раз, прежде всего по меньшей мере в 10 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 15 раз выше, чем аффинность к связыванию с мономером Аβ.

Антитела, предлагаемые в изобретении, обладают способностью ингибировать *in vitro* и *in vivo* агрегацию амилоидогенных мономерных пептидов, в частности, β-амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные Аβ-пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерных Аβ₁₋₄₂-пептидов, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации, прежде всего при совместной инкубации с амилоидными мономерными пептидами, прежде всего β-амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные Аβ-пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерными Аβ₁₋₄₂-пептидами, ингибирует агрегацию Аβ-мономеров, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации, прежде всего при совместной инкубации при соотношении молярных концентраций вплоть до 1:100, более предпочтительно при соотношении молярных концентраций от 1:30 до 1:100, но особенно предпочтительно при соотношении молярных концентраций 1:100, с амилоидными мономерными пептидами, прежде всего с β-амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные Аβ-пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерными Аβ₁₋₄₂-пептидами, ингибирует агрегацию Аβ-мономеров с образованием высокомолекулярных полимерных фибрилл. В частности, уровни ингибирования составляют по меньшей мере 50%, прежде всего по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере 85-90% или более по сравнению с вариантом, в котором соответствующие амилоидные мономерные пептиды инкубировали в буфере (контроль).

В частности, совместную инкубацию антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными пептидами осуществляют в течение периода времени, составляющего от 24 до 60 ч, прежде всего от 30 до 50 ч, более предпочтительно в течение 48 ч при температуре от 28 до 40°C, прежде всего от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации в течение 48 ч при 37°C при соотношении молярных концентраций 1:100 с амилоидными мономерными пептидами, прежде всего с β-амилоидным мономерным пептидом, таким, например, как мономерный Аβ-пептид 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерным Аβ₁₋₄₂-пептидом, обладает способностью ингибировать агрегацию амилоидных мономеров, прежде всего агрегацию мономерных β-амилоидных пептидов, таких, например, как мономерные Аβ пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерный Аβ₁₋₄₂-пептид, приводящую к образованию

высокомолекулярных полимерных фибрилл или филаментов, по меньшей мере на 85%, прежде всего по меньшей мере на 89% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% по сравнению с вариантом, в котором соответствующие амилоидные мономерные пептиды инкубировали в буфере (контроль).

5 Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое обладает высокой специфичностью в отношении мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, но практически не обладает или обладает лишь незначительной перекрестной реактивностью на мономерные пептиды $A\beta_{1-38}$,
 10 $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$ и/или $A\beta_{1-41}$, прежде всего антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где чувствительность антитела к амилоидному $A\beta_{1-42}$ -пептиду превышает его чувствительность к $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ вплоть
 15 до 100 раз, предпочтительно от 50 до 100 раз, более предпочтительно от 80 до 100 раз, но наиболее предпочтительно в 100 раз, и чувствительность антитела к амилоидному $A\beta_{1-42}$ -пептиду превышает его чувствительность к $A\beta_{1-38}$ вплоть до раз 1000 раз, предпочтительно от 500 до 1000 раз, более предпочтительно от 800 до 1000 раз, но особенно предпочтительно в 1000, и в результате обладает способностью ингибировать
 20 *in vitro* и *in vivo* агрегацию амилоидогенных мономерных пептидов, но прежде всего амилоидного $A\beta_{1-42}$ -пептида.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое обладает высокой
 25 чувствительностью к связыванию с амилоидным $A\beta_{1-42}$ -пептидом и обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ вплоть до концентрации, составляющей по меньшей мере 0,001 мкг, но прежде всего в концентрации, составляющей от 0,5 и 0,001 мкг, более предпочтительно от 0,1 до 0,001 мкг, но наиболее предпочтительно в
 30 концентрации 0,001 мкг.

Одним из наиболее предпочтительных конкретных вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ вплоть до минимальной
 35 концентрации, составляющей 0,001 мкг, волокна $A\beta_{1-40}$ вплоть до минимальной концентрации, составляющей 0,1 мкг, а волокна $A\beta_{1-38}$ вплоть до минимальной концентрации волокон, составляющей 1 мкг.

Связывание антител, предлагаемых в изобретении и описанных выше, с амилоидогенными мономерными пептидами, но прежде всего с амилоидной формой
 40 (1-42), приводит к ингибированию агрегации мономерных амилоидогенных пептидов с образованием высокомолекулярных фибрилл или филаментов. Вследствие ингибирования агрегации амилоидогенных мономерных пептидов антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают способностью предупреждать или
 45 замедлять образование амилоидных бляшек, прежде всего амилоидной формы (1-42), которая, как известно, становится нерастворимой в результате изменения вторичной конформации и представляет собой основную часть амилоидных бляшек в головном мозге больных животных или людей.

Способность антител, предлагаемых в изобретении, ингибировать агрегацию можно

определять любым приемлемым методом, известным в данной области, прежде всего ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом продукта седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте и/или с помощью флуоресцентного анализа с использованием тιοфлавина Т (Th-T).

Настоящее изобретение относится также к антителам, которые при совместной инкубации с ранее сформированным высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные А β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерных А β ₁₋₄₂-пептидов, обладают способностью нарушать агрегацию (разрушать агрегаты) высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации при соотношении молярных концентраций вплоть до 1:100, более предпочтительно при соотношении молярных концентраций от 1:30 до 1:100, но особенно предпочтительно при соотношении молярных концентраций 1:100, с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности, β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные А β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерных А β ₁₋₄₂-пептидов, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 35%, прежде всего по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 70% или более.

В частности, совместную инкубацию антитела, предлагаемого в изобретении, с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами осуществляют в течение периода времени, составляющего от 12 до 36 ч, прежде всего от 18 до 30 ч, более предпочтительно в течение 24 ч при температуре от 28 до 40°C, прежде всего от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации в течение 24 ч при 37°C при соотношении молярных концентраций 1:100 с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные А β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные А β ₁₋₄₂-пептиды, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 35%, прежде всего по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 70% или более по сравнению с вариантом, в котором соответствующие ранее сформированные амилоидные полимерные фибриллы или филаменты инкубировали с контрольным

наполнителем (только амилоид) (контроль).

Способность антител, предлагаемых в изобретении, нарушать агрегацию можно определять любыми приемлемыми методами, известными в данной области, прежде всего ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом
 5 седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте и/или с помощью флуоресцентного анализа с использованием тиофлавина Т (Th-T).

Настоящее изобретение относится также к антителам или их функциональным фрагментам, которые обладают чувствительностью к конформации.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего
 10 моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных
 15 мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные A β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерных A β ₁₋₄₂-пептидов, обладает способностью индуцировать переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной
 20 области молекулы, прежде всего в окрестности Val12 A β -белка, что приводит к повышению доли конформации в виде произвольной спирали за счет β -складчатой конформации и повышает сольубилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов. В частности, происходит снижение доли β -складчатой конформации по меньшей мере на 30%, прежде всего по меньшей
 25 мере на 35% и более предпочтительно по меньшей мере на 40% и более по сравнению с соответствующими ранее сформированными амилоидными полимерными фибриллами или филаментами, которые инкубировали в буфере (контроль).

В частности антитело, предлагаемое в изобретении, совместно инкубируют с
 30 амилоидными ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами в течение периода времен, составляющего от 12 до 36 ч, прежде всего от 18 до 30 ч, более предпочтительно в течение 24 ч при температуре от 28 до 40°C, прежде всего от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

В частности, настоящее изобретение относится к антителу, прежде всего
 35 моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации в течение 24 ч при 37°C при соотношении молярных концентраций 1:100 с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов,
 40 прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные A β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные A β ₁₋₄₂-пептиды, обладает способностью индуцировать переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в
 45 конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной области молекулы, прежде всего в окрестности Val12 A β -белка, что приводит к повышению доли конформации в виде произвольной спирали относительно β -складчатой конформации, при этом доля

последней снижается по меньшей мере на 30%, прежде всего по меньшей мере на 35% и более предпочтительно по меньшей мере на 40% и более по сравнению с соответствующими ранее сформированными амилоидными полимерными фибриллами или филаментами, которые инкубировали в буфере (контроль).

Способность антитела индуцировать конформационный переход можно определять любым приемлемым методом, известным в данной области, прежде всего с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии твердого тела, но предпочтительно путем определения интегральных интенсивностей, обусловленных конформациями Val12 C β в A β -пептиде, прежде всего в A β -пептидах 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно в мономерном A β ₁₋₄₂-пептиде.

Посредством нарушения амилоидогенных полимерных фибрилл или филаментов антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают способностью предупреждать или замедлять образование амилоидных бляшек, что приводит к облегчению симптомов, ассоциированных с заболеванием, и замедлять или прекращать его развитие.

Таким образом, следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, описанные выше, где антитело обладает способностью снижать общее количество A β в головном мозге животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышенной концентрации A β в головном мозге.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, описанные выше, где антитело обладает способностью разрушать бляшки, снижая тем самым загрузку бляшками (т.е. относительную площадь поверхности, занятую бляшками) головного мозга животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышенной загрузке бляшками головного мозга. Антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, описанные выше, снижает загрузку бляшками головного мозга по меньшей мере на 20%, прежде всего по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно более чем на 30%.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, описанные выше, где антитело обладает способностью солубилизировать бляшки, снижая тем самым количество бляшек в головном мозге животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышенной загрузке бляшками головного мозга. Антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, снижает количество бляшек в головном мозге по меньшей мере на 10%, прежде всего по меньшей мере на 15%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%.

Следует понимать, что антитело, предлагаемое в изобретении, может обладать одним, двумя или большим количеством описанных выше специфических свойств в различных комбинациях.

Например, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения являются антитела, но прежде всего моноклональные антитела, включая любое функционально

эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, причем антитела являются бифункциональными в том плане, что они обладают как способностью ингибировать агрегацию, так и способностью разрушать агрегаты, как описано выше, прежде всего в сочетании с высоким уровнем чувствительности к конформации.

Еще одним вариантом изобретения является бифункциональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, но прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации с амилоидными мономерными пептидами, прежде всего β -амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, ингибирует агрегацию мономеров $A\beta$, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл или филаментов, а также при совместной инкубации с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов.

В конкретном варианте осуществления изобретения совместную инкубацию бифункционального антитела, предлагаемого в изобретении, но прежде всего бифункционального моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными пептидами и ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами соответственно осуществляют при соотношении молярных концентраций вплоть до 1:100, прежде всего при соотношении от 1:30 до 1:100 и более предпочтительно при соотношении 1:100.

В частности, совместную инкубацию антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными пептидами осуществляют в течение периода времени, составляющего от 24 до 60 ч, прежде всего от 30 до 50 ч, более предпочтительно в течение 48 ч при температуре от 28 до 40°C, прежде всего от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C, где совместную инкубацию с амилоидом ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов осуществляют в течение периода времени, составляющего от 12 до 36 ч, прежде всего от 18 до 30 ч, более предпочтительно в течение 24 ч при температуре от 28 до 40°C, прежде всего от 32 до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

Согласно еще одному конкретному варианту осуществления изобретения бифункциональное антитело, предлагаемое в изобретении, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 10%, прежде всего по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 60-70% или более.

Согласно еще одному конкретному варианту осуществления изобретения бифункциональное антитело, предлагаемое в изобретении, прежде всего

бифункциональное моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, ингибирует агрегацию амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, по меньшей мере на 50%, прежде всего по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 85-90% или более по сравнению с вариантом, в котором соответствующие амилоидные мономерные пептиды инкубируют в буфере (контроль).

В частности настоящее изобретение относится к антителу, прежде всего бифункциональному антителу, но предпочтительно моноклональному антителу, прежде всего бифункциональному моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело опосредует ингибирование полимеризации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, и/или индуцирует солюбилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, посредством специфического и непосредственного связывания антитела с фибриллами $A\beta$, что приводит к переходу вторичной конформации.

Настоящее изобретение относится к антителу, прежде всего бифункциональному антителу, но предпочтительно моноклональному антителу, прежде всего бифункциональному моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело непосредственно и специфически связывается с β -амилоидными волокнами, такими, например, как волокна, которые содержат мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно с волокнами мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, и/или индуцирует солюбилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, путем направленного и специфического связывания с эпитопом в эпитопной области β -амилоидного белка, прежде всего эпитопной области $A\beta$ -полипептида, ограниченной аминокислотными остатками ak_n-ak_m , где n обозначает целое число от 2 до 16, прежде всего от 5 до 16, более предпочтительно от 8 до 16, еще более предпочтительно от 10 до 16, а m обозначает целое число от 3 до 25, в частности от 3 до 23, в частности от 3 до 20, в частности от 3 до 17, в частности от 6 до 17, более предпочтительно от 9 до 17, еще более предпочтительно от 11 до 17, где n и m не могут иметь идентичные значения и n всегда должно иметь значение более низкое, чем значение m , при этом различие между n и m должно составлять ≥ 2 .

В конкретном варианте осуществления изобретения n обозначает целое число от 13 до 15, но прежде всего 14, а m обозначает целое число от 22 до 24, но прежде всего 23.

Связывание антитела, предлагаемого в изобретении, может индуцировать конформационный переход у указанного белка, прежде всего переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной области в молекуле, прежде всего в окрестности Val12 A β -белка.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает по меньшей мере одним из указанных выше свойств, выбранных из группы, включающей ингибирование агрегации, нарушение агрегации, индукцию конформационного перехода, распознавание и непосредственное связывание с эпитопом, прежде всего с конформационным прерывистым эпитопом в 14-23-области, прежде всего в 14-20-области, предупреждая или замедляя формирование амилоидных бляшек, снижая общее количество растворимого A β в головном мозге, снижая загрузку бляшками головного мозга, снижая количество бляшек в головном мозге, сохраняя или повышая когнитивную способность к запоминанию, но прежде всего комбинацией двух или большего количества указанных свойств.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает по меньшей мере 2, прежде всего по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 4, еще более предпочтительно по меньшей мере 5, 6, 7 или 8, но особенно предпочтительно всеми вышеуказанными свойствами.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но предпочтительно моноклональное антитело, особенно предпочтительно бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает высокой специфичностью в отношении мономерных A β ₁₋₄₂-пептидов, но практически не обладает или обладает лишь незначительной перекрестной реактивностью на мономерные пептиды A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀ и/или A β ₁₋₄₁, прежде всего антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где чувствительность антитела к амилоидному A β ₁₋₄₂-пептиду превышает его чувствительность к A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₁ вплоть до 100 раз, предпочтительно от 50 до 100 раз, более предпочтительно от 80 до 100 раз, но наиболее предпочтительно в 100 раз, и чувствительность антитела к амилоидному A β ₁₋₄₂-пептиду превышает его чувствительность к A β ₁₋₃₈ вплоть до 1000 раз, предпочтительно от 500 до 1000 раз, более предпочтительно от 800 до 1000 раз, но особенно предпочтительно в 1000 раз, и в результате обладает способностью ингибировать *in vitro* и *in vivo* агрегацию амилоидогенных мономерных пептидов, но прежде всего амилоидного A β ₁₋₄₂-пептида.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое обладает высокой аффинностью к амилоидному A β ₁₋₄₂-пептиду

и обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ в концентрации, сниженной по меньшей мере вплоть до 0,001 мкг, но прежде всего в концентрации, составляющей от 0,5 и 0,001 мкг, более предпочтительно от 0,1 до 0,001 мкг, но наиболее предпочтительно в концентрации 0,001 мкг.

Одним из наиболее предпочтительных конкретных вариантов осуществления изобретения является антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ в концентрации, сниженной вплоть до минимальной концентрации, составляющей 0,001 мкг, а фибриллы $A\beta_{1-40}$ в концентрации, сниженной вплоть до минимальной концентрации, составляющей 0,1 мкг, а фибриллы $A\beta_{1-38}$ в концентрации, сниженной вплоть до минимальной концентрации фибрилл, составляющей 1 мкг.

Еще одним объектом изобретения является антитело или его фрагмент, которое(ый) распознает и связывается по меньшей мере с одним конкретным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где по меньшей мере один или по меньшей мере два индивидуальных сайта связывания содержат по меньшей мере один аминокислотный остаток и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые главным образом ответственны за связывание антитела, при этом в конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один остаток, образующий первый индивидуальный сайт связывания, представляет собой Leu, а по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие второй индивидуальный сайт связывания, представляют собой -Phe-Phe-, которые находятся в следующей коровой последовательности:

- Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ -, где

Xaa₁ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Xaa₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Xaa₃ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Lys, His, Asn, Gln и Arg;

Xaa₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Xaa₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Xaa₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Xaa₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp.

В частности, изобретение относится к антителу или его фрагменту, которое(ый)

распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где по меньшей мере один или по меньшей мере два индивидуальных сайта связывания содержат по меньшей мере один аминокислотный остаток и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые главным образом ответственны за связывание антитела, при этом в конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один остаток, образующий первый индивидуальный сайт связывания, представляет собой Leu, а по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие второй индивидуальный сайт связывания, представляют собой -Phe-Phe-, которые находятся в следующей коровой последовательности:

- Хаа₁ - Хаа₂ - Хаа₃ - Leu - Хаа₄ - Phe - Phe - Хаа₅ - Хаа₆ - Хаа₇ -, где

Хаа₁ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₂ - Asn и Gln;

Хаа₃ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Lys, His, Asn, Gln и Arg;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp,

Хаа₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, в которых

Хаа₁ обозначает His или Arg, но прежде всего His;

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но прежде всего Gln;

Хаа₃ обозначает Lys или Arg, но прежде всего Lys;

Хаа₄ обозначает Val или Leu, но прежде всего Val;

Хаа₅ обозначает Ala или Val, но прежде всего Ala;

Хаа₆ обозначает Glu или Asp, но прежде всего Glu; и

Хаа₇ обозначает Asp или Glu, но прежде всего Asp.

Следующим объектом изобретения является антитело или его фрагмент, которое (ый) распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где по меньшей мере каждый один, или по меньшей мере два, или по меньшей мере три индивидуальных сайта связывания содержат по меньшей мере один аминокислотный остаток и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые главным образом ответственны за связывание антитела.

В частности, антитело или его фрагмент, предлагаемое(ый) в изобретении, связывается по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном

белке, где по меньшей мере каждый из двух индивидуальных сайтов связывания содержит по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, которые главным образом ответственны за связывание антитела, где по меньшей мере два индивидуальных сайта связывания локализованы в непосредственной близости друг от друга на антигене, отделяясь друг от друга по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками, формируя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, которое(ый) распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где индивидуальные сайты связывания содержат по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые главным образом ответственны за связывание антитела, где по меньшей мере одна и по меньшей мере две последовательно расположенные аминокислоты, которые отделены друг от друга по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которые главным образом ответственны за связывание антитела, представляют собой -His- и -Lys-Leu- соответственно, находящиеся в следующей коровой последовательности:

- His - Хаа₂ - Lys - Leu - Хаа₃ - Хаа₄ - Хаа₅ - Хаа₆ - Хаа₇ - Хаа₈ -, где

Хаа₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₃ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu and Asp;

Хаа₈ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp,

и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His- и -Lys-Leu-.

Следующим объектом изобретения является антитело или его фрагмент, которое (ый) распознает и связывается по меньшей мере с одним индивидуальным сайтом связывания, прежде всего по меньшей мере с двумя индивидуальными сайтами связывания, более предпочтительно по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где индивидуальные сайты связывания содержат

по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, которые главным образом ответственны за связывание антитела, где по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, образующие первый сайт связывания, представляют собой -Phe-Phe-, а по меньшей мере один аминокислотный остаток представляет собой -His-, которые находятся в следующей коровой последовательности:

Хаа₁ - His - Хаа₃ - Хаа₄ - Хаа₅ - Хаа₆ - Phe - Phe - Хаа₇ - Хаа₈ - Хаа₉ -, где

Хаа₁ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₃ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu и Ile;

Хаа₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu и Ile;

Хаа₈ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu and Asp,

Хаа₉ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₁, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ и Хаа₉ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания His и -Phe-Phe-.

В конкретном варианте осуществления изобретения первые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, которые главным образом ответственны за связывание антитела, представляют собой -Lys- и -Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных остатков представляют собой -Phe-Phe-, которые находятся в следующей коровой последовательности:

- Хаа₁ - Хаа₂ - Lys - Leu - Хаа₄ - Phe - Phe - Хаа₅ - Хаа₆ - Хаа₇ -, где

Хаа₁ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln, Lys и Arg;

Хаа₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с

сайтом связывания -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₁ обозначает His или Arg, но прежде всего His;

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но прежде всего Gln;

Хаа₄ обозначает Val или Leu, но прежде всего Val;

Хаа₅ обозначает Ala или Val, но прежде всего Ala;

Хаа₆ обозначает Glu или Asp, но прежде всего Glu; и

Хаа₇ обозначает Asp или Glu, но прежде всего Asp.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело или его фрагмент, предлагаемое(ый) в изобретении, связывается по меньшей мере с тремя индивидуальными сайтами связывания на β -амилоидном белке, где по меньшей мере три индивидуальных сайта связывания содержат по меньшей мере один аминокислотный остаток и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, причем эти остатки главным образом ответственны за связывание антитела, где по меньшей мере три индивидуальных сайта связывания локализованы в непосредственной близости друг к другу на антигене, отделяясь друг от друга по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с одним аминокислотным остатком и по меньшей мере двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками соответственно, формируя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

В конкретном варианте осуществления изобретения первые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, главным образом ответственных за связывание антитела, представляют собой -Lys-Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков представляют собой -Phe-Phe-, а третий по меньшей мере один аминокислотный остаток представляет собой -His-, которые находятся в следующей коровой последовательности: -His - Хаа₂ - Lys - Leu - Хаа₄ - Phe - Phe - Хаа₅ - Хаа₆ - Хаа₇ -, где

Хаа₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp;

Хаа₇ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и

где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His-, -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но прежде всего Gln;

Хаа₄ обозначает Val или Leu, но прежде всего Val;
 Хаа₅ обозначает Ala или Val, но прежде всего Ala;
 Хаа₆ обозначает Glu или Asp, но прежде всего Glu; и
 Хаа₇ обозначает Glu или Asp, но прежде всего Asp.

В конкретном варианте осуществления изобретение первые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, главным образом ответственных за связывание антитела, представляют собой -Lys-Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков представляют собой -Phe-Phe-, а третий по меньшей мере один аминокислотный остаток представляет собой -Asp-, которые находятся в следующей коровой последовательности:

- Хаа₁ - Хаа₂ - Lys - Leu - Хаа₄ - Phe - Phe - Хаа₅ - Хаа₆ - Asp -, где

Хаа₁ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей His, Asn, Gln Lys и Arg;

Хаа₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Asp-, -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело или его фрагмент, в котором

Хаа₁ обозначает His или Arg, но прежде всего His;

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но прежде всего Gln;

Хаа₄ обозначает Val или Leu, но прежде всего Val;

Хаа₅ обозначает Ala или Val, но прежде всего Ala; и

Хаа₆ обозначает Glu или Asp, но прежде всего Glu.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело или его фрагмент, предлагаемое(ый) в изобретении, связывается по меньшей мере с четырьмя индивидуальными сайтами связывания на β-амилоидном белке, где четыре индивидуальных сайта связывания содержат один аминокислотный остаток и два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, причем эти остатки главным образом ответственны за связывание антитела, где четыре индивидуальных сайта связывания локализованы в непосредственной близости друг к другу на антигене, отделяясь друг от друга по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не участвует в связывании антитела или участвует в существенно меньшей степени по сравнению с одним аминокислотным остатком и двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками четырех индивидуальных сайтов связывания, формируя тем самым конформационный прерывистый эпитоп.

В частности, первые из двух последовательно расположенных аминокислотных остатков, главным образом ответственных за связывание антитела, представляют собой

-Lys-Leu-, а вторые из по меньшей мере двух последовательно расположенных аминокислотных остатков представляют собой -Phe-Phe-, первый из индивидуальных аминокислотных остатков представляет собой -His-, а второй из индивидуальных аминокислотных остатков представляет собой -Asp-, которые находятся в следующей

коровой последовательности:

- His - Хаа₂ - Lys - Leu - Хаа₄ - Phe - Phe - Хаа₅ - Хаа₆ - Asp -, где

Хаа₂ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Asn и Gln;

Хаа₄ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe и Ile;

Хаа₅ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Ala, Val, Leu, Ser и Ile;

Хаа₆ означает аминокислотный остаток, выбранный из группы, включающей Glu и Asp, и где аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не участвуют в связывании антитела или участвуют в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -His-, -Asp-, -Lys-Leu и -Phe-Phe-.

В конкретном варианте осуществления изобретения сайты распознавания и связывания, как они определены выше, формируют конформационный прерывистый эпитоп, локализованный в области β-амилоидного белка между аминокислотными остатками 12-24, прежде всего между остатками 14-23, более конкретно между аминокислотными остатками 14 и 20, при этом три индивидуальных сайта распознавания и связывания, которые содержат 1 и 2 аминокислотных остатка соответственно, локализованы в положении 16, 17, в положении 19 и 20 и в положении 14 соответственно, при этом указанные остатки главным образом ответственны за связывание β-амилоидного белка и при этом три различных сайта распознавания и связывания отделены одним аминокислотным остатком, локализованным в положении 15 и 18 соответственно, эти аминокислоты не участвуют в связывании антигена или участвуют в существенно меньшей степени.

В конкретном варианте осуществления изобретения последовательно расположенные аминокислотные остатки, прежде всего -Lys-Leu- в положении 16 и 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20, которые главным образом ответственны за связывание β-амилоидного белка, находятся в следующей коровой области:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательно расположенные аминокислотные остатки, прежде всего -Lys- в положении 16, -Leu- в положении 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20 и -His- в положении 14, которые главным образом ответственны за связывание β-амилоидного белка, находятся в следующей коровой области:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, вырабатывается против фрагмента антигена, который не содержит указанный индивидуальный сайт связывания.

Указанный сдвиг в эпитопной области можно по меньшей мере частично вызывать

применением надмолекулярной антигенной конструкции, которая содержит антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, прежде всего β -амилоидного пептида A β_{1-16} , модифицированного с помощью гидрофильного фрагмента, такого например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), где гидрофильный фрагмент ковалентно связан с каждым концом антигенного пептида по меньшей мере через одну, прежде всего через одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин, глутаминовая кислота и цистеин, или любую другую приемлемую аминокислоту или аналог аминокислоты, которые могут служить связующим элементом для сочетания гидрофильного фрагмента с описанным ниже пептидным фрагментом, в процессе иммунизации. Когда ПЭГ применяют в качестве гидрофильного фрагмента, то свободные концы ПЭГ ковалентно связывают с фосфатидилэтаноламином или любым другим соединением, которое может функционировать в качестве «заякоривающего» элемента, например, для встраивания антигенной конструкции в бислой липосомы, как представлено в настоящем описании.

Для сдвига эпитопной области в качестве компонента протокола иммунизации можно применять липид А.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (LCVR), последовательность которой представлена в SEQ ID NO:7.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является вариабельная область легкой цепи (LCVR), последовательность которой представлена в SEQ ID NO:7.

Еще одним конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), последовательность которой представлена в SEQ ID NO:8.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является вариабельная область тяжелой цепи (HCVR), последовательность которой представлена в SEQ ID NO:8.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, которое содержит как вариабельную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:8, так и вариабельную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:7.

Под объем изобретения подпадает антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (LCVR), или вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), или обе указанные области, вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), гомологичную любому из пептидов, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:7 и 8 соответственно.

В частности, изобретение относится к антителу или его фрагменту, предлагаемому в настоящем изобретении и описанному выше, в котором вариабельная область легкой цепи (LCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO:7.

Изобретение относится также к антителу или его фрагменту, предлагаемому в настоящем изобретении и описанному выше, в котором вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO:8.

Изобретение относится также к антителу или его фрагменту, предлагаемому в

настоящем изобретении и описанному выше, в котором и вариабельная область легкой цепи (LCVR) и вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) вместе имеют аминокислотные последовательности, которые на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO:7 и 8.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является вариабельная область легкой цепи (LCVR), аминокислотная последовательность которой на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO:7.

Еще одним конкретным вариантом осуществления изобретения является вариабельная область тяжелой цепи (HCVR), аминокислотная последовательность которой на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO:8

Следующим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше.

В частности, изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, содержащему

а) по меньшей мере нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:9,

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Следующим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, содержащий

а) по меньшей мере нуклеотидную последовательность легкой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:10,

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по

меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Следующим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, содержащий

а) по меньшей мере нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:11,

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, содержащий

а) по меньшей мере нуклеотидную последовательность тяжелой цепи, которая представлена в SEQ ID NO:12, или комплементарную последовательность,

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Изобретение относится также к полинуклеотиду, который содержит

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, которая кодирует вариабельную область легкой цепи,

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по

меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Изобретение относится также к полинуклеотиду, который содержит

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, которая

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Изобретение относится также к полинуклеотиду, который содержит

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11, которая

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), которая содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Изобретение относится также к полинуклеотиду, который содержит

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12, которая

б) нуклеотидную последовательность, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательность, комплементарную последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагмент нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

Следующим вариантом осуществления изобретения является любая нуклеотидная

последовательность, которая гибридизуется с

а) нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в изобретении и представленной в SEQ ID NO:9, 10, 11 и 12 соответственно,

б) нуклеотидной последовательностью, которая отличается от нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), последовательностью кодонов, связанной с вырожденностью генетического кода,

в) последовательностью, комплементарной последовательностям, указанным в подпунктах (а) и (б), или

г) фрагментом нуклеотидной последовательности, указанной в подпункте (а), (б) или (в), который содержит состоящий из смежных нуклеотидов участок, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 30 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 35 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 40 смежных нуклеотидов, по меньшей мере из 45 смежных нуклеотидов и по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов.

В частности, изобретение относится к любой нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в общепринятых условиях гибридизации, прежде всего в строгих условиях гибридизации, с нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в изобретении и представленной в SEQ ID NO:9, 10, 11 и 12 соответственно, в частности с ее комплементарной цепью.

Следующим вариантом осуществления изобретения является любая нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в настоящем изобретении и представленной в SEQ ID NO:9, 10, 11 и 12 соответственно, прежде всего с ее комплементарной цепью, в общепринятых условиях гибридизации, например, с применением в качестве раствора 5×SSPE, 1% ДСН, 1×раствора Денхардта и/или при температуре гибридизации от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C. После гибридизации отмывку предпочтительно осуществляют сначала с использованием 2×SSC, 1% ДСН, а затем 0,2×SSC при температуре от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C (описание состава SSPE, SSC и раствора Денхардта см. у Sambrook и др., loc. cit. (в упомянутом месте)).

В частности, изобретение относится к любой нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в настоящем изобретении и представленной в SEQ ID NO:9, 10, 11 и 12 соответственно, прежде всего с ее комплементарной цепью, в строгих условиях гибридизации, описанных, например, у Sambrook и др., выше, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации, при которых гибридизацию и отмывку осуществляют при 65°C, как описано выше.

Конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело, предпочтительно бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридом, выбранной из группы FP 12H3, FP 12H3-C2 и FP 12H3-G2, которые депонированы 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно, под регистрационными номерами DSM ACC2752, DSM ACC 2750 и DSM ACC2751 соответственно.

Более конкретно изобретение относится к антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря

2005 г. соответственно, под регистрационным номером DSM ACC2752.

Более конкретно изобретение относится к моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3-C2, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно, под регистрационным номером DSM ACC2750.

Более конкретно изобретение относится к моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3-G2, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно, под регистрационным номером DSM ACC2751.

Другим конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело, предпочтительно бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридомы ET 7E3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2755.

Более предпочтительно изобретение относится к моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы ET 7E3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2755.

Другим конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело, предпочтительно бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридомы EJ 7H3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2756.

Более предпочтительно изобретение относится к моноклональному антителу, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы EJ 7H3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2756.

Следующим объектом настоящего изобретения являются способы и композиции, содержащие антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, которые предназначены для предупреждения, и/или терапевтического лечения, и/или облегчения воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-

Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, например, путем пассивной иммунизации человека или животного антителом, предлагаемым в изобретение и описанным выше.

Другим объектом настоящего изобретения является способ применения моноклонального антитела и/или его функционального фрагмента, предлагаемого в изобретении, композиций антитела, предлагаемого в изобретении и описанного выше, для диагностики и терапевтического лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

В частности, объектом настоящего изобретения является способ применения моноклоального антитела и/или его функционального фрагмента, предлагаемого в изобретении, и композиций, содержащих антитело, прежде всего биспецифическое или обладающее двойной эффективностью антитело, но прежде всего биспецифическое или обладающее двойной эффективностью моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, для снижения и предупреждения неврологических заболеваний, включая (но не ограничиваясь ею) болезнь Альцгеймера.

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат антитело, прежде всего биспецифическое или обладающее двойной эффективностью антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего в терапевтически эффективном количестве, или более предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего биспецифическое или обладающее двойной эффективностью моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего в терапевтически эффективном количестве, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

В частности, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает способностью ингибировать агрегацию амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или

филаментов, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации при соотношении молярных концентраций вплоть до 1:100, более предпочтительно при соотношении молярных концентраций от 1:30 до 1:100, но особенно предпочтительно при соотношении молярных концентраций 1:100, с амилоидными мономерными пептидами, прежде всего с β -амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные A β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные A β ₁₋₄₂-пептиды, ингибирует агрегацию A β -мономеров, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл или филаментов. В частности, уровень ингибирования составляет по меньшей мере 50%, прежде всего по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере 85-90% или более по сравнению с вариантом, в котором соответствующие амилоидные мономерные пептиды инкубируют в буфере (контроль) и необязательно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

В частности, совместную инкубацию антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными пептидами осуществляют в течение 48 ч при температуре 37°C.

Способность антител, предлагаемых в изобретении, ингибировать агрегацию можно определять ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом продуктов седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте и/или с помощью флуоресцентного анализа с использованием тιοфлавина Т (Th-T).

Настоящее изобретение относится также к композиции, содержащей антитело, которое может нарушать агрегацию высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные A β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные A β ₁₋₄₂-пептиды, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Посредством нарушения амилоидогенных полимерных фибрилл или филаментов антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают способностью предупреждать или замедлять образование амилоидных бляшек, что приводит к облегчению симптомов, ассоциированных с заболеванием, и замедлению или прекращению его развития.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации при соотношении молярных концентраций от 1:30 до 1:100, предпочтительно при соотношении молярных концентраций 1:100, с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные A β -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно

предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, прежде всего при совместной инкубации в течение 24 ч при температуре 37°C, обладает способностью нарушать агрегацию высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 35%, прежде всего по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, ее более предпочтительно по меньшей мере на 60%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 70% или более, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Способность антител, предлагаемых в изобретении, нарушать агрегацию можно определять ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом продуктов седиментации с использованием ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте и/или с помощью флуоресцентного анализа с использованием тιοфлавина Т (Th-T).

Настоящее изобретение относится также композиции, содержащей антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает конформационной чувствительностью, прежде всего в эффективном количестве, более предпочтительно в терапевтически эффективном количестве.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, прежде всего при совместной инкубации в течение 24 ч при температуре 37°C, обладает способностью индуцировать переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной области молекулы, прежде всего в окрестности Val12 $A\beta$ -белка, что приводит к повышению доли конформации в виде произвольной спирали за счет β -складчатой конформации и повышает солубилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент. В частности, происходит снижение доли β -складчатой конформации по меньшей мере на 30%, прежде всего по меньшей мере на 35% и более предпочтительно по меньшей мере на 40% и более по сравнению с соответствующими ранее сформированными амилоидными полимерными фибриллами или филаментами, которые инкубируют в буфере (контроль).

Способность антитела индуцировать конформационный переход во вторичной структуре определяют с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии твердого тела, но предпочтительно путем определения интегральной интенсивности конформаций Val12 C β в $A\beta$ -пептиде, прежде всего в $A\beta_{1-42}$ -пептиде.

Настоящее изобретение относится также композиции, содержащей антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего в терапевтически эффективном количестве, где антитело представляет собой бифункциональное антитело, которое обладает как способностью ингибировать агрегацию, так и способностью нарушать агрегацию, как указано выше, предпочтительно в сочетании с высокой

конформационной чувствительностью, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая бифункциональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело при совместной инкубации с амилоидными мономерными пептидами, в частности β -амилоидными мономерными пептидами, такими, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, ингибирует агрегацию $A\beta$ -мономеров, приводящую к образованию высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, и, кроме того, при совместной инкубации с ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, образованными в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

В конкретном варианте осуществления изобретения совместную инкубацию бифункционального антитела, предлагаемого в изобретении, но прежде всего бифункционального моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении, с амилоидными мономерными пептидами и ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами соответственно осуществляют при соотношении молярных концентраций вплоть до 1:100, предпочтительно при соотношении от 1:30 до 1:100 и более предпочтительно при соотношении 1:100.

В другом варианте осуществления изобретения совместную инкубацию с амилоидными мономерными пептидами и ранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами соответственно осуществляют в течение 48 ч и 24 ч соответственно при температуре 37°C.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая бифункциональное антитело, предлагаемое в изобретении, но прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, которое обладает способностью нарушать агрегацию ранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 10%, прежде всего по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 60-70% или более, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая бифункциональное антитело, предлагаемое в изобретении, но прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, которая ингибирует агрегацию амилоидных мономерных пептидов, в частности β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но особенно предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, по меньшей

мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 85-90% или более, по сравнению с вариантом, когда соответствующие мономеры амилоидных пептидов инкубируют в буфере (контроль), и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но предпочтительно моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело опосредует ингибирование полимеризации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, и/или индуцирует солюбилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, посредством специфического и непосредственного связывания антитела с волокнами $A\beta$, что приводит к переходу вторичной конформации, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Настоящее изобретение относится также к композиции, содержащей антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело непосредственно и специфически связывается с β -амилоидными волокнами, такими, например, как волокна, которые содержат мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно с волокнами мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, и/или индуцирует солюбилизацию ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов, которые образовались в результате агрегации амилоидных мономерных пептидов, прежде всего β -амилоидных мономерных пептидов, таких, например, как мономерные $A\beta$ -пептиды 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 или 1-43, но предпочтительно мономерные $A\beta_{1-42}$ -пептиды, путем направленного и специфического связывания с эпитопной областью β -амилоидного белка, прежде всего эпитопной областью $A\beta$ -полипептида, ограниченной аминокислотными остатками ak_n - ak_m , где n обозначает целое число от 2 до 15, прежде всего от 5 до 15, более предпочтительно от 8 до 15, еще более предпочтительно от 10 до 15, а m обозначает целое число от 3 до 17, прежде всего от 6 до 17, более предпочтительно от 9 до 17, еще более предпочтительно от 11 до 17, где n и m не могут иметь идентичные значения и n всегда должно иметь значение более низкое, чем значение m , при этом различие между n и m должно составлять ≥ 2 , и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Связывание антитела, предлагаемого в изобретении, может индуцировать конформационный переход указанного белка, прежде всего переход β -складчатой конформации в конформацию в виде α -спирали и/или произвольной спирали, но прежде всего в конформацию в виде произвольной спирали, еще более предпочтительно в конформацию в виде произвольной спирали в конкретной области в молекуле, прежде всего в окрестности Val12 $A\beta$ -белка.

Еще одним конкретным вариантом осуществления изобретения является композиция,

содержащая антитело, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает по меньшей мере одним из указанных выше свойств, выбранных из группы, включающей ингибирование агрегации, нарушение агрегации, индукцию конформационного перехода, распознавание и непосредственное связывание с эпитопной 14-16- и/или 14-23-областью, но прежде всего с эпитопной 14-20-областью, но прежде всего комбинацией двух или большего количества указанных свойств, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но предпочтительно моноклональное антитело, особенно предпочтительно бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое обладает высокой специфичностью в отношении мономерных $A\beta_{1-42}$ -пептидов, но практически не обладает или обладает лишь незначительной перекрестной реактивностью на мономерные пептиды $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$ и/или $A\beta_{1-41}$, прежде всего антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где чувствительность антитела к амилоидному $A\beta_{1-42}$ -пептиду превышает его чувствительность к $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ вплоть до 100 раз, предпочтительно от 50 до 100 раз, более предпочтительно от 80 до 100 раз, но наиболее предпочтительно в 100 раз, и чувствительность антитела к амилоидному $A\beta_{1-42}$ -пептиду превышает его чувствительность к $A\beta_{1-38}$ вплоть до раз 1000 раз, предпочтительно от 500 до 1000 раз, более предпочтительно от 800 до 1000 раз, но особенно предпочтительно в 1000, и в результате обладает способностью ингибировать *in vitro* и *in vivo* агрегацию амилоидогенных мономерных пептидов, но прежде всего амилоидного $A\beta_{1-42}$ -пептида, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Следующим конкретным вариантом осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое обладает высокой чувствительностью к связыванию с амилоидным $A\beta_{1-42}$ -пептидом и обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ в концентрации, сниженной по меньшей мере вплоть до 0,001 мкг, но прежде всего в концентрации, составляющей от 0,5 до 0,001 мкг, более предпочтительно от 0,1 до 0,001 мкг, но наиболее предпочтительно в концентрации 0,001 мкг, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Одним из наиболее предпочтительных конкретных вариантов осуществления изобретения является композиция, содержащая антитело, прежде всего бифункциональное антитело, но особенно предпочтительно моноклональное антитело, прежде всего бифункциональное моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает способностью выявлять волокна $A\beta_{1-42}$ вплоть до минимальной концентрации, составляющей 0,001 мкг, а волокна $A\beta_{1-40}$ вплоть до минимальной концентрации, составляющей 0,1 мкг, а волокна $A\beta_{1-38}$ вплоть до минимальной концентрации волокон, составляющей 1 мкг, и необязательно фармацевтически

приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является композиция, содержащая моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридом, выбранной из группы, включающей FP 12H3, FP 12H3-C2 и FP 12H3-G2, которые депонированы 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно под регистрационными номерами DSM ACC2752, DSM ACC 2750 и DSM ACC2751 соответственно, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Более конкретно изобретение относится к композиции, содержащей моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно под регистрационным номером DSM ACC2752, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Более конкретно изобретение относится к композиции, содержащей моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3-C2, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно под регистрационным номером DSM ACC2750, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Изобретение относится также к композиции, содержащей моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы FP 12H3-G2, депонированной 01 декабря 2005 г. и 09 декабря 2005 г. соответственно под регистрационным номером DSM ACC2751, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Другим конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является композиция, содержащая моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридомы ET 7E3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2755, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Изобретение относится также к композиции, содержащей моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы ET 7E3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2755.

Другим конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения является композиция, содержащая моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, где антитело обладает характерными свойствами антитела, которое продуцируется линией клеток гибридомы EJ 7H3, депонированной 08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2756, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Изобретение относится также к композиции, содержащей моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, которое продуцируется линией клеток гибридомы EJ 7H3, депонированной

08 декабря 2005 г. под регистрационным номером DSM ACC2756, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или разбавитель, и/или эксципиент.

Антитело, прежде всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные
 5 фрагменты, можно вводить в сочетании с другими биологически активными субстанциями и процедурами, предназначенными для лечения заболеваний. Другие биологически активные субстанции могут быть компонентами той же композиции, которая уже содержит антитело, предлагаемое в изобретении, в форме смеси, при этом антитело и другую биологически активную субстанцию смешивают в фармацевтически
 10 приемлемом растворителе и/или носителе или с ним, или они могут присутствовать отдельно в виде компонента других композиций, которые могут поступать в продажу отдельно или вместе в форме состоящего из компонентов набора.

Антитело, прежде всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные
 15 фрагменты, можно вводить в сочетании с другой(ими) биологически активной(ыми) субстанцией или субстанциями поочередно или последовательно. Например, моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, и первую дополнительную биологически активную субстанцию можно вводить одновременно или последовательно,
 20 вводя субстанцию после или до введения антитела. Если выбрана приемлемая схема, при которой в сочетании по меньшей мере с одним антителом, предлагаемым в изобретении, вводят более одной дополнительной обладающей биологической активностью субстанции, то соединения или субстанции можно частично вводить одновременно, частично последовательно в различных комбинациях.

Другим объектом настоящего изобретения являются смеси антител, содержащие по
 25 меньшей мере одно антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, и необязательно одну или несколько дополнительных биологически активных субстанций, а также способы применения индивидуальных антител или смесей, которые включают композиции, содержащие антитела или смеси антител, для предупреждения, и/или
 30 терапевтического лечения, и/или облегчения воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния,
 35 характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с
 40 амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные
 45 опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Смеси, предлагаемые в изобретении, могут содержать помимо антитела, предлагаемого в изобретении, биологически активную субстанцию, такую, например, как известные соединения, применяемые для медикаментозного лечения заболеваний

и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобным белком, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с амилоидом или амилоидоподобным белком, таким как Аβ-белок, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

5 В следующем варианте осуществления изобретения другая биологически активная субстанция или соединение может представлять собой также терапевтический агент, который можно применять для лечения заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, вызываемый амилоидом β, или их можно применять для медикаментозного лечения
10 других неврологических нарушений.

Другая биологически активная субстанция или соединение может обладать биологическим действием, опосредуемым таким же или сходным механизмом, что и антитело, предлагаемое в изобретении, или обладать неродственным механизмом действия или сочетанием родственных и/или неродственных механизмов действия.

15 Как правило, другое биологически активное соединение может представлять собой энхансеры нейтронной трансмиссии, психотерапевтические лекарственные средства, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, блокаторы кальциевых каналов, биогенные амины, транквилизаторы на основе бензодиазепинов, усилители синтеза, накопления или высвобождения ацетилхолина, агонисты постсинаптического рецептора ацетилхолина,
20 ингибиторы моноаминоксидазы-А или -В, антагонисты рецептора N-метил-D-аспартатглутамата (NMDA), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, антиоксиданты и антагонисты серотонергического рецептора.

В частности, смесь, предлагаемая в изобретении, может содержать по меньшей мере одно другое биологически активное соединение, выбранное из группы, включающей
25 соединения против окислительного стресса, антиапоптозные соединения, хелаты металлов, ингибиторы репарации ДНК, такие как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновую кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активаторы секретаз, ингибиторы β- и γ-секретаз, тау-белки, нейромедиатор, разрушители β-складчатой конформации, противовоспалительные молекулы или ингибиторы
30 холинэстеразы (ChEI), такие как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, и другие лекарственные средства и пищевые добавки, в сочетании с антителом, предлагаемым в изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем, и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения смеси, предлагаемые в изобретении, могут содержать ниацин или мемантин в сочетании с антителом,
35 предлагаемым в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем, и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются смеси, которые содержат «атипичные антипсихотические средства», такие, например, как клозапин, зипрасидон,
40 рисперидон, арипипразол или оланзапин, предназначенные для лечения позитивных или негативных психотических симптомов, включая галлюцинации, бред, нарушения мышления (проявляющиеся в выраженной непоследовательности действий, психическом расстройстве, расстройстве ассоциативного мышления) и эксцентричное или неорганизованное поведение, а также ангедонию, пониженную эмоциональную реакцию,
45 апатию и отказ от общества, в сочетании с антителом, предлагаемым в изобретении, необязательно фармацевтически приемлемым носителем, и/или разбавителем, и/или эксципиентом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения композиции и смеси,

предлагаемые в изобретении и описанные выше, содержат антитело, предлагаемое в изобретении, и биологически активную субстанцию соответственно в терапевтически или профилактически эффективном количестве.

Другие соединения, которые можно применять в смесях в сочетании с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, описаны, например, в WO 2004/058258 (см. прежде всего сс.16 и 17), включая мишени терапевтических лекарственных средств (сс.36-39), алкансульфоновые кислоты и алкансерную кислоту (сс.39-51), ингибиторы холинэстеразы (сс.51-56), антагонисты NMDA-рецептора (сс.56-58), эстрогены (сс.58-59), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (сс.60-61), антиоксиданты (сс.61-62), агонисты рецепторов, активируемых пероксисомальными пролифераторами (PPAR) (сс.63-67), агенты, понижающие уровень холестерина (сс.68-75); ингибиторы амилоида (сс.75-77), ингибиторы образования амилоида (сс.77-78), хелаторы металлов (сс.78-79), антипсихотические средства и антидепрессанты (сс.80-82), пищевые добавки (сс.83-89) и соединения, повышающие доступность биологически активных субстанций в головном мозге (см. сс.89-93) и пролекарства (сс.93 и 94); указанный документ включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Кроме того, изобретение относится к способу получения антитела, прежде всего способу получения моноклонального антитела, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, предлагаемые в изобретении, заключающийся в том, что получают антитела, но прежде всего моноклональные антитела, к надмолекулярной антигенной конструкции, которая содержит антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, прежде всего β -амилоидного пептида $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ и $A\beta_{1-16}$ ($\Delta 14$), модифицированного с помощью гидрофобных фрагментов, таких, например, как пальмитиновая кислота, или гидрофильного фрагмента, такого, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), или комбинацией их обоих, где гидрофобный и гидрофильный фрагмент соответственно связывают с помощью ковалентной связи с каждым концом по меньшей мере через одну, прежде все одну или две аминокислоты, такие, например, как лизин или любая другая приемлемая аминокислота или аналог аминокислоты, которые могут служить в качестве соединяющего элемента или линкерной молекулы для сшивания гидрофобного и гидрофильного фрагмента с пептидным фрагментом, такие, например, как глутаминовая кислота или цистеин.

Изобретение относится также к применению моноклонального антитела и/или его функционального фрагмента, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и/или фармацевтической композиции, или смеси, содержащей антитело, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или облегчения воздействия заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с

ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ
 5 получения фармацевтической композиции с использованием антитела, предлагаемого в изобретении и/или его функционального фрагмента, но прежде всего моноклонального антитела и/или его функционального фрагмента или функционально эквивалентного антитела, предназначенной для лечения воздействий заболеваний и нарушений, которые
 10 вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся
 15 утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь
 20 Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, заключающийся в том, что приготавливают препарат антитела, предлагаемого в изобретении, в виде
 25 фармацевтически приемлемой формы.

Антитела и/или их функциональные фрагменты, но прежде всего моноклональные антитела и/или их функциональные фрагменты или функционально эквивалентное антитело и композиции и смеси, содержащие антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять для приготовления лекарственного средства,
 30 предназначенного для предупреждения, лечения или облегчения воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические
 35 заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона,
 40 а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные
 45 опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ снижения загрузки бляшками головного мозга животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое

приводит к повышенной загрузке бляшками головного мозга, заключающийся в том, что вводят животному, прежде всего млекопитающему, но предпочтительно человеку, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве антитело и/или его функциональный фрагмент, но прежде всего моноклональное антитело и/или его функциональный фрагмент или функционально эквивалентное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, или композицию или смесь, содержащую антитело.

В частности, загрузку бляшками головного мозга снижают по меньшей мере на 20%, прежде всего по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно более чем на 30%.

Еще одним вариантом осуществления изобретение является способ снижения количества бляшек в головном мозге животного, прежде всего млекопитающего, но предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышенной загрузке бляшками головного мозга, заключающийся в том, что вводят животному, прежде всего млекопитающему, но предпочтительно человеку, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве антитело и/или его функциональный фрагмент, но прежде всего моноклональное антитело и/или его функциональный фрагмент или функционально эквивалентное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, или композицию или смесь, содержащую антитело.

В частности, количество бляшек в головном мозге снижают по меньшей мере на 10%, прежде всего по меньшей мере на 15%, более предпочтительно более чем на 15%.

Еще одним вариантом осуществления изобретение является способ снижения общего количества растворимого А β в головном мозге животного, прежде всего млекопитающего, но особенно предпочтительно человека, страдающего заболеванием или состоянием, которое приводит к повышению концентраций растворимого А β в головном мозге, заключающийся в том, что животному, прежде всего млекопитающему, но более предпочтительно человеку, который нуждается в таком лечении, вводят в терапевтически эффективном количестве антитело и/или его функциональный фрагмент, но прежде всего моноклональное антитело и/или его функциональный фрагмент или функционально эквивалентное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, или композицию или смесь, содержащую антитело.

Объектом настоящего изобретения является способ предупреждения, лечения или облегчения воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая

дегенерацию желтого пятна, путем введения антитела, но прежде всего моноклонального антитела или композиции или смеси, содержащей антитело, предлагаемое в изобретении, животному или человеку, пораженному указанным нарушением, заключающийся в том, что животному, прежде всего млекопитающему, но особенно предпочтительно

5 человеку, который нуждается в таком лечении, вводят в терапевтически эффективном количестве антитело и/или его функциональный фрагмент, но прежде всего моноклональное антитело и/или его функциональный фрагмент или функционально эквивалентное антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, или композицию или смесь, содержащую антитело.

10 Конкретным вариантом осуществления изобретения является способ сохранения или повышения когнитивной способности к запоминанию у животного, прежде всего млекопитающего или человека, страдающего нарушением памяти, заключающийся в том, что животному, прежде всего млекопитающему или человеку, который нуждается в таком лечении, вводят в терапевтически эффективном количестве антитело, но прежде

15 всего моноклональное антитело, предлагаемое в изобретении, или композицию или смесь, содержащую антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ приготовления фармацевтической композиции с использованием антитела, предлагаемого в изобретении, и/или его функционального фрагмента, но прежде всего

20 моноклонального антитела и/или его функционального фрагмента или функционально эквивалентного антитела, предназначенной для предупреждения, лечения или облегчения воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая

25 вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна,

30 наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой

35 склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является способ приготовления фармацевтической композиции с использованием антитела, предлагаемого в

40 изобретении, и/или его функционального фрагмента, но прежде всего моноклонального антитела и/или его функционального фрагмента или функционально эквивалентного антитела, которая предназначена для сохранения или повышения когнитивной способности к запоминанию у животного, прежде всего млекопитающего или человека, страдающего нарушением памяти, путем введения животному, прежде всего

45 млекопитающему или человеку, антитела, но прежде всего моноклонального антитела или композиции или смеси, содержащей антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше.

Эти и другие объекты, отличительные признаки и преимущества настоящего

изобретения станут очевидными после ознакомления с приведенным ниже подробным описанием вариантов осуществления изобретения и прилагаемой формулой изобретения.

Понятия «полипептид», «пептид» и «белок» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо, и они обозначают биологическую молекулу, состоящую из аминокислот, сцепленных пептидной связью.

В контексте настоящего описания упоминание единственного числа может обозначать «один или несколько», и, если не указано иное, то оно включает множественное число.

Понятия «выявление (обнаружение)» или «выявленный (обнаруженный)» в контексте настоящего описания означает применение известных методик для выявления биологических молекул, таких как иммунохимические или гистологические методы, и относятся к качественному или количественному выявлению присутствия или определения концентрации исследуемой биологической молекулы.

Понятие «амилоид β , A β или β -амилоид» имеет значение, известное в данной области, и относится к белкам или пептидам амилоида β , белку-предшественнику амилоида β (APP), а также к их модификациям, фрагментам и любым функциональным эквивалентам. В частности, под понятие «амилоид β » в контексте настоящего описания подпадает любой фрагмент, полученный протеолитическим расщеплением APP, но прежде всего фрагменты, которые участвуют или которые ассоциированы с амилоидной патологией, включая (но не ограничиваясь ими) A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β , A β ₁₋₄₁, A β ₁₋₄₂ и A β ₁₋₄₃.

Структура и последовательности указанных выше пептидов амилоида β хорошо известны в специалистам в данной области, и методы получения указанных пептидов или их экстракции из головного мозга и других тканей описаны, например, у Glenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 1984, сс.885-890. Кроме того, пептиды амилоида β поступают в продажу в различных формах.

Понятия «фибриллы A β », или «филамент A β », или «амилоидные фибриллы» относятся к полимерным формам мономерного белка, образующим индивидуальные или связанные в узел волокна с постоянным диаметром волокна, которые являются нерастворимыми в водной среде и содержат большие количества кросс- β -структур в ядре; главным образом с бета-цепями, расположенными перпендикулярно оси волокна (1,2,3).

«Мономерный A β » или «мономер A β » означает полностью солубилизованный белок амилоида β без агрегированных комплексов в водной среде.

Понятия «полимерный растворимый амилоид», и «олигомерный A β », и «олигомер A β » относятся к множеству агрегированных мономеров амилоидных пептидов, или амилоидоподобных пептидов, или модифицированных или укороченных амилоидных пептидов, или других производных амилоидных пептидов, формирующих олигомерные или полимерные структуры, которые растворимы как *in vitro* в водной среде, так и *in vivo* в организме млекопитающего или человека, более конкретно в головном мозге, но прежде всего понятия относятся к множеству агрегированных мономеров амилоида β (A β) или модифицированного или укороченного амилоида β . A β -пептиды или их производные растворимы в организме млекопитающего или человека, прежде всего в головном мозге соответственно.

Понятие «выделенный» относится к биологической молекуле, свободной по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она встречается в естественных условиях.

Понятия «антитело» или «антитела» в контексте настоящего описания имеют известное с данной области значение и относятся к молекулам или активным фрагментам молекул, которые связываются с известными антигенами, прежде всего к молекулам иммуноглобулинов и к иммунологически активным фрагментам молекул

иммуноглобулинов, т.е. молекулам, которые содержат сайт связывания, иммуноспецифически связывающийся с антигеном. Иммуноглобулин, предлагаемый в изобретении, может относиться к любому типу (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), или классу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), или подклассам молекул иммуноглобулина.

5 Согласно настоящему изобретению подразумевается, что к «антителам» относятся моноклональные антитела, поликлональные, химерные, одноцепочечные, биспецифические или обладающие двойной эффективностью, симианизированные (включающие участки обезьяньих антител), человеческие и гуманизированные антитела, а также их активные фрагменты. Например, к активным фрагментам молекул, которые
10 связываются с известными антигенами, относятся Fab- и F(ab')₂-фрагменты, включая продукты экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов иммуноглобулинов, и связывающиеся с эпитопом фрагменты любых антител и их указанных фрагментов.

Указанные активные фрагменты можно получать из антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с помощью многочисленных методик. Например, очищенные
15 моноклональные антитела можно расщеплять ферментом, таким как пепсин, и подвергать ЖХВР-гель-фильтрации. Затем соответствующую фракцию, содержащую Fab-фрагменты, можно собирать и концентрировать с помощью фильтрации через мембрану и т.п. Дополнительное описание общих методик выделения активных фрагментов антител см., например, у Khaw B.A. и др. J. Nucl. Med. 23, 1982, сс.1011-1019; Rouseaux и др. Methods Enzymology, 121, изд-во Academic Press, 1986, сс.663-669.
20

Понятие «гуманизированное антитело» относится к типу сконструированного антитела, в котором CDR получены из иммуноглобулина организма-донора кроме человека, остальные выведенные из иммуноглобулина области получают из одного (или нескольких) человеческого(их) иммуноглобулина(ов). Кроме того, поддерживающие
25 каркас остатки (остатки каркасного участка) можно изменять для сохранения аффинности к связыванию. Методы получения «гуманизированных антител» хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Queen и др., Proc.Natl Acad Sci USA, 86, 1989, сс.10029-10032, Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421).

«Гуманизированное антитело» можно получать также с помощью нового подхода
30 генетической инженерии, который позволяет получать напоминающие человеческие поликлональные антитела с созревшей аффинностью в крупных животных, таких, например, как кролики (<http://www.rctech.com/bioventures/thercipeutic.php>).

Понятие «моноклональное антитело» хорошо известно в данной области и относится к антителу, которое в больших количествах получают в лабораторных условиях из
35 индивидуального клона и которое распознает только один антиген. Моноклональные антитела, как правило, создают путем слияния продуцирующей антитела В-клетки, как правило, с коротким временем жизни, с быстро растущей клеткой, такой как раковая клетка (иногда ее называют «иммортилизованной» клеткой). Образовавшаяся гибридная клетка или гибридома быстро размножается, создавая клон, который продуцирует
40 антитело в больших количествах.

Для целей настоящего изобретения к «моноклональному антителу» относят также антитела, полученные с помощью маточного клона, который еще не достиг полной моноклональности.

Понятие «функциональный эквивалент антитела» в контексте настоящего изобретения
45 относится к антителу, которое в целом сохраняет по меньшей мере одно из основных функциональных свойств антитела, в том числе: способность к специфическому связыванию с белком β-амилоида, прежде всего с белком Aβ₁₋₄₂ и более предпочтительно

с эпитопной 4-16-областью белка $A\beta_{1-42}$, иммунореактивность *in vitro*, ингибирование агрегации мономеров $A\beta_{1-42}$, приводящей к образованию высокомолекулярных полимерных фибрилл, и/или нарушение агрегации ранее сформированных полимерных фибрилл $A\beta_{1-42}$ и/или нарушение правильности β -складчатой конформации и облегчение

5 воздействий заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая (но не

10 ограничиваясь ими) неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа

15 Дутча); комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз; болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых; старческий

20 сердечный амилоидоз; эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, при введении с целью профилактики или лечения. Антитела могут принадлежать к любому классу, такому как IgG, IgM или IgA и т.д., или любому подклассу, такому как IgG1, IgG2a и т.д., и другим упомянутым выше или известным в данной области подклассам, но прежде всего к классу IgG2. Кроме того, антитела

25 можно получать с помощью любого метода, такого как фаговая презентация, или получать в любом организме или линии клеток, в том числе в клетках бактерий, насекомых, млекопитающих или другом типе клеток или клеточных линий, которые продуцируют антитела с требуемыми характеристиками, такие как гуманизированные антитела. Антитела можно создавать также путем объединения Fab-фрагмента и Fc-

30 участка из различных видов.

Понятие «биспецифический» или «бифункциональный» и «обладающий двойной эффективностью» используют в контексте настоящего описания в качестве синонимов для того, чтобы охарактеризовать антитело, которое обладает как способностью ингибировать образование амилоидных или амилоидоподобных волокон, так и

35 способностью нарушать агрегацию амилоидных или амилоидоподобных волокон.

Понятие «антиген» относится к полному агенту или его фрагменту, который может индуцировать иммунный ответ в организме, прежде всего в организме животного, более предпочтительно млекопитающего, включая человека. Понятие включает иммуногены и области, ответственные за антигенность, или антигенные детерминанты.

40 В контексте настоящего описания понятие «растворимый» обозначает частично или полностью растворимый в водном растворе.

В контексте настоящего описания понятие «иммуногенные» относится к субстанциям, которые вызывают или усиливают производство антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток, направленных против иммуногенного агента и участвующих в

45 иммунном ответе в организме человека или животных.

Иммунный ответ имеет место, когда в организме индивидуума продуцируется достаточное количество антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток против введенных иммуногенных композиций, предлагаемых в настоящем изобретении,

для ослабления или облегчения подлежащего лечению нарушения.

Понятие «полимерный растворимый амилоид» относится к множеству агрегированных мономеров амилоидных пептидов или амилоидоподобных пептидов, или модифицированных или укороченных амилоидных пептидов, или других производных амилоидных пептидов, которые образуют олигомерные или полимерные структуры, растворимые в организме млекопитающего или человека, в частности в головном мозге, но прежде всего к множеству агрегированных мономеров амилоида β (A β) или модифицированных или укороченных пептидов амилоида β (A β) или их производных, которые растворимы в организме млекопитающего или человека, более предпочтительно в головном мозге.

Понятие «гибридома» известно в данной области и обычным специалистам в данной области и относится к клетке, полученной слиянием продуцирующей антитело клетки и immortalized клетки, например клетки множественной миеломы. Эта гибридная клетка обладает способностью обеспечивать постоянную поставку антител (см. выше определение понятия «моноклональное антитело» и ниже раздел «Примеры», в которых метод слияния описан более подробно).

Понятие «носитель» в контексте настоящего описания означает структуру, в которую антигенный пептид или надмолекулярную конструкцию можно встраивать или с которой их можно ассоциировать, осуществляя тем самым презентацию или обеспечивая доступность антигенных пептидов или фрагмента пептида для иммунной системы человека или животных. Любую частицу, которую можно применять для лечения животных или человека, такую, например, как пузырек, частицу или состоящее из частиц тельце, можно использовать в качестве носителя в контексте настоящего изобретения.

Под понятие «носитель» подпадают также методы введения, при которых композиции надмолекулярных антигенных конструкций, содержащих антигенный пептид, можно транспортировать к требуемым областям с помощью механизмов введения. Одним из примеров такой системы введения является система, в которой используют коллоидные металлы, такие как коллоидное золото.

Кроме того, под понятие «носитель» подпадают также другие механизмы введения, известные специалистам в данной области, включая (но не ограничиваясь ими) гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) и другие адъюванты.

В надмолекулярной антигенной конструкции, предлагаемой в настоящем изобретении, липосома может выполнять двойную функцию, в том плане, что ее можно применять в качестве носителя, содержащего описанную выше надмолекулярную конструкцию, и в то же время она может выполнять функцию адъюванта, повышающего или стимулирующего иммунный ответ в животном- или человеке-мишени, подлежащем лечению терапевтической вакциной, предлагаемой в изобретении. Следует понимать также, что композиции надмолекулярных антигенных конструкций, предлагаемых в настоящем изобретении, могут содержать также дополнительные адъюванты, такие, например, как липид А, квасцы, фосфат кальция, интерлейкин 1 и/или микрокапсулы полисахаридов и белков, но прежде всего детоксифицированный липид А, такой как монофосфорильный или дифосфорильный липид А, или квасцы, дополнительные консерванты, разбавители, эмульгаторы, стабилизаторы и другие компоненты, которые являются известными и которые нашли применение в известных из существующего уровня техники вакцинах. Кроме того, любую известную в данной области систему адъювантов можно применять в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. К таким адъювантам относятся (но не ограничиваясь ими) неполный адъювант Фрейнда,

полный адъювант Фрейнда, полидисперсный β -(1,4)-связанный ацетилированный маннан («Асеманнан»), TITERMAX® (адъюванты на основе сополимера полиоксиэтилена-полиоксипропилена фирмы CytRx Corporation), модифицированные липидные адъюванты фирмы Chiron Corporation, адъюванты, являющиеся производными сапонины фирмы Cambridge Biotech, убитые Bordetella pertussis, липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий, крупные полимерные анионы, такие как сульфат декстрана, и неорганические гели, такие как квасцы, гидроксид алюминия или фосфат алюминия.

Белки-носители, которые можно применять в композициях надмолекулярных антигенных конструкций, предлагаемых в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь ими) белок, связывающий мальтозу «MBP»; бычий сывороточный альбумин «BSA»; гемоцианин лимфы улитки «KLH»; яичный белок, флагеллин; тироглобулин; сывороточный альбумин любых видов; гамма-глобулин любых видов; сингенные клетки; сингенные клетки, несущие антигены Ia; и полимеры D- и/или L-аминокислот.

Кроме того, понятие «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, которое при введении человеку или животному вызывает иммунный ответ, который является достаточным для оказания терапевтического действия на человека или животного. Эффективное количество легко может определить специалист в данной области с помощью общепринятых процедур.

«Гомологию» между двумя последовательностями определяют по идентичности последовательностей. Если две последовательности, которые требуется сравнить друг с другом, различаются по длине, то идентичность последовательностей предпочтительно относится к проценту нуклеотидных остатков в более короткой последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам более длинной последовательности. Идентичность последовательностей можно определять с помощью общепринятых компьютерных программ, таких как программа Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Программа Bestfit основана на использовании локального алгоритма гомологии Смита и Ватермана (Smith и Waterman, Advances in Applied Mathematics 2, 1981, сс.482-489), для поиска сегмента, характеризующегося самой высокой идентичностью последовательности между двумя последовательностями. При использовании Bestfit или другой программы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей для определения того, идентична ли конкретная последовательность, например на 95%, последовательности, с которой производят сравнение (референс-последовательность), предлагаемой в настоящем изобретении, параметры предпочтительно регулируют так, чтобы процент идентичности рассчитывать для всей длины референс-последовательности и при этом при определении указанного уровня гомологии разрешается введение брешей, количество которых составляет вплоть до 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности. Когда используют программу Bestfit, то так называемым необязательным параметрам предпочтительно оставляют ранее установленные («принятые по умолчанию») значения. Отклонения, появляющиеся при сравнении данной последовательности и вышеописанных последовательностей, предлагаемых в изобретении, могут обуславливаться, например, добавлением, делецией, заменой, инсерцией или рекомбинацией. Такое сравнение последовательностей можно предпочтительно осуществлять с помощью программы «fasta20u66» (версия 2.0u66, сентябрь 1998 г., разработанной William R. ФЭArson и Университетом Виргинии, см. также W. R. ФЭArson,

Methods in Enzymology 183, 1990, сс.63-98, прилагаемые примеры, а также <http://workbench.sdsc.edu/>). Для этой цели можно использовать набор «задаваемых по умолчанию параметров».

Понятие «гибридизовать» в контексте настоящего описания относится к
 5 общепринятым условиям гибридизации, предпочтительно условиям гибридизации, при которых в качестве раствора применяют 5×SSPE, 1% ДСН, 1×раствора Денхардта и/или гибридизацию проводят при температуре от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C. После гибридизации отмывку предпочтительно осуществляют сначала с использованием 2×SSC, 1% ДСН, а затем 0,2×SSC при температуре от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C
 10 (описание состава SSPE, SSC и раствора Денхардта см. у Sambrook и др., loc. cit.). Наиболее предпочтительными являются строгие условия гибридизации, описанные, например, у Sambrook и др. выше. Особенно предпочтительными строгими условиями гибридизации являются, например, условия, при которых гибридизацию и отмывку осуществляют при 65°C, как описано выше. Менее предпочтительной является
 15 гибридизация в условиях пониженной жесткости, когда, например, гибридизацию и отмывку осуществляют при 45°C, и еще менее предпочтительно, когда их осуществляют при 35°C.

С целью облегчения понимания настоящего изобретения ниже представлено подробное описание конкретных вариантов его осуществления. Хотя настоящее
 20 изобретение описано со ссылкой на конкретные детали определенных вариантов его осуществления, следует понимать, что не подразумевается, что указанные детали можно рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

Настоящее изобретение относится к антителам и их функциональным фрагментам, представляющим собой чувствительные к определенной конформации (конформационно
 25 чувствительные) антитела. Эти антитела распознают конкретные эпитопы на широком разнообразии амилоидных белковых антигенов. Антитела можно применять для диагностики и терапии заболеваний и нарушений, которые вызываются или ассоциированы с амилоидом или амилоидоподобными белками, включая амилоидоз, группу заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоида или
 30 амилоидоподобного белка, такого как белок Аβ, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

Антитела вводят индивидуумам с целью пассивной иммунизации против различных заболеваний или нарушений, включая (но не ограничиваясь ими) заболевания, ассоциированные с амилоидным белком, такие как болезнь Альцгеймера.

35 Антитела в контексте настоящего описания представляют собой моноклональные или поликлональные антитела, обладающие способностью специфически связываться с антигенными пептидами, характерными для различных нарушений, которые ассоциированы с амилоидным белком, таких как болезнь Альцгеймера.

Антитела, предлагаемые в изобретении, получают иммунизацией животных, таких
 40 как мыши, крысы, кролики или любые виды животных, в которых могут образовываться нативные или человеческие антитела при использовании композиции надмолекулярной антигенной конструкции.

Надмолекулярные антигенные конструкции, предлагаемые в настоящем изобретении, как правило, содержат пептиды, модифицированные с целью усиления антигенного
 45 действия, при этом указанные пептиды можно модифицировать путем пэгилирования (используя полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль) или модифицировать с помощью других методов, например с использованием пальмитиновой кислоты, полиаминокислот (например, полиглицина, полигистидина),

полисахаридов (например, полигалактуроновой кислоты, полимолочной кислоты, полигликолида, хитина, хитозана), синтетических полимеров (полиамиды, полиуретаны, сложные полиэфиры) или сополимеров (например, поли(метакриловой кислоты) и N-(2-гидрокси)пропилметакриламида) и т.п.

Модификация пальмитиновой кислотой (пальмитоилирование), обеспечивающая «заякоривание» пептида в бислое липосомы из-за относительно небольшой длины фрагментов жирной кислоты $C_{16:0}$, приводит к тому, что пептид практически простирается на поверхности липосомы. Таким образом, клетки, процессирующие антиген, должны включать полную липосому с пептидом, что в большинстве случаев приводит к сравнительно более медленному иммунному ответу.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицированный амилоидный 1-15-пептид используют для получения антитела, прежде всего моноклонального антитела, предлагаемого в изобретении. Модифицированный амилоидный 1-15-пептид можно синтезировать с помощью метода, описанного у Nicolau и др., 2002. Подход, описанный у Nicolau с соавторами, включает модификацию антигенного пептида путем осуществления прививки на смоле липофильного или гидрофобного фрагмента с концевыми аминокислотными остатками ранее полученного пептида, в результате чего получают продукт, обладающий сравнительно высокой чистотой. В частности, защищенную аминокислоту, прежде всего защищенную с помощью Fmoc аминокислоту, присоединяют к смоле с помощью известной химии сочетания. Защитную группу удаляют и сшивают со вторым защищенным аминокислотным остатком. Затем применяют стандартный автоматический пептидный синтез с использованием известной процедуры химической защиты, в частности Fmoc/tBu-химии, и стандартных защитных групп боковых цепей для синтеза антигенного A β -пептида, прежде всего антигенного A β_{1-15} -пептида, путем сочетания аминокислот 1-15 амилоидного белка A β_{1-42} с получением пептидного фрагмента, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:1. На конечной стадии для удлинения пептидного фрагмента связывают две дополнительные аминокислоты. Затем Mtt-группы можно избирательно расщеплять и сшивать с пальмитиновой кислотой. После промывки смолы защитную группу удаляют и смолу одновременно расщепляют с последующим удалением защитных групп боковых цепей с помощью стандартной методологии. После этого получают конечный продукт высокой чистоты и его идентичность подтверждают известными в данной области методами, такими, например, как масс-спектрометрия с использованием электроспрея.

Липофильный или гидрофобный фрагмент, предлагаемый в настоящем изобретении, может представлять собой жирную кислоту, триглицерид или фосфолипид, где углеродный каркас жирной кислоты содержит по меньшей мере 10 атомов углерода. В частности, липофильный или гидрофобный фрагмент представляет собой жирную кислоту, углеродный каркас которой содержит по меньшей мере примерно 14 атомов углерода и вплоть до примерно 24 атомов углерода, при этом под объем настоящего изобретения подпадает вариант с каждым индивидуальным количеством атомов углерода в указанном диапазоне. Более конкретно липофильный или гидрофобный фрагмент имеет углеродный каркас, состоящий по меньшей мере из 14 атомов углерода. Примерами гидрофобных фрагментов являются (но не ограничиваясь ими) пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, миристиновая кислота, лауриновая кислота, олеиновая кислота, линолевая кислота и линоленовая кислота и холестерин или DSPE. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения липофильный или гидрофобный фрагмент представляет собой пальмитиновую кислоту.

Для реконструкции пептида в липосоме с целью усиления иммунного ответа можно

применять другой якорь/спейсер, например полиэтиленгликоль (ПЭГ).

ПЭГ присоединяют в помощь ковалентной связи к аминокислотному остатку, связанному с обоими концами пептида, в частности к аминокислотному остатку Glu, Cys или Lys, или любому другому аминокислотному остатку, который можно использовать для присоединения с помощью ковалентной связи ПЭГ к пептиду. Другой конец цепи гидрофобного фрагмента можно ковалентно связывать с функциональным элементом, таким как якорь в бислое липосомы, таким, например, как фосфатидилэтаноламин (ФЭА). В результате этого липосома начинает функционировать также качестве адъюванта, и пептид, находясь на достаточном удалении от бислоя, может процессироваться индивидуально, и это повышает его иммуногенность по сравнению с пальмитоилированным антигеном.

В конкретных вариантах осуществления изобретения надмолекулярные антигенные конструкции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат пептидную последовательность, ковалентно связанную с одним пэгилированным лизином на каждом из концов. Длина ПЭГ-(полиэтиленгликолевой) цепи может варьироваться от $n=8$ до $n=150000$ или более, в частности от $n=10$ до $n=80000$, более предпочтительно от $n=20$ до $n=10000$. В конкретном варианте осуществления изобретения длина ПЭГ-цепи не превышает $n=45$, прежде всего составляет от $n=5$ до $n=40$, более предпочтительно от $n=10$ до $n=30$ и наиболее предпочтительно $n=10$.

Надмолекулярные конструкции, представленные в настоящем описании, можно синтезировать с помощью автоматизированного пептидного синтеза с использованием известной процедуры химической защиты, в частности Fmoc/tBu-химии, и стандартных защитных групп боковых цепей. Как правило, пэгилирование пептидов приводит к получению смесей региоизомеров.

Для достижения сайтспецифического присоединения конъюгата ПЭГ-липид как к С- так и N- концу $A\beta$ можно использовать частично защищенные пептиды. Для этой цели пептидные последовательности, содержащие внутренние остатки Lys или His, ортогонально защищенные Lys(ivDde), добавляют к каждому концу. Для облегчения синтеза можно добавлять к С-концу дополнительный Gly. Защитную группу удаляют и N-ацетилюют с помощью уксусного ангидрида с последующим избирательным расщеплением ivDde-групп.

Предпочтительной является смола, прежде всего 2-хлортритильная смола, поскольку она чувствительна к действию кислот и поэтому позволяет осуществлять выделение защищенных пептидов.

В конкретном варианте осуществления изобретения реакцию сочетания осуществляют в фазе раствора. Избирательное отщепление от смолы в мягких условиях затем позволяет высвобождать защищенные внутри цепи пептиды.

В фазе раствора успешно осуществляли реакции сочетания пептидов, выведенных из последовательности белка β -амилоида, такого, например, как $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO:2), с молекулой ПЭГ, модифицированной с помощью жирной кислоты - фосфатидилхолина, такой, например, как DSPE. Разделение моно- и дважды сшитых продуктов перед конечной стадией удаления защитных групп боковой цепи можно осуществлять с помощью катионообменной хроматографии. Последующее удаление защитных групп боковых цепей приводит к выделению требуемых конъюгатов с приемлемой степенью чистоты. Очистку можно осуществлять с помощью методов, хорошо известных в данной области, таких, например, как ЖХВР и т.д.

Этот подход к синтезу N- и С-концевых липид-ПЭГ- β -амилоидных антигенов с использованием защищенных пептидов можно применять для широкого разнообразия

пептидных последовательностей.

Затем можно получать липосомные антигены, предлагаемые в изобретении, с помощью метода, описанного у Nicolau и др., 2002. Модифицированный антигенный пептид амилоида β , прежде всего модифицированный с помощью ПЭГ и пальмитоилированный антигенный пептид $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, $A\beta_{22-35}$ и $A\beta_{29-40}$, можно реконструировать в липосомных конструкциях, представляющих собой прежде всего липосомы из димидистеинфосфатидилхолина (DMPC), димиристеинфосфатидилэтаноламина (DMFEA), димиристеинфосфатидилглицерина (DMPG) и холестерина, необязательно содержащие монофосфорильный липид А.

В конкретном варианте осуществления изобретения липосомы с липидом А использовали в качестве адъюванта для приготовления антиамилоидной вакцины. Димиристеинфосфатидилхолин, глицерин и холестерин смешивали в молярном соотношении 0,9:1,0:0,7. Монофосфорильный липид А, представляющий собой сильный иммуномодулятор, добавляли в приемлемой концентрации, прежде всего в концентрации от 30 до 50 мг на ммоль, более предпочтительно 40 мг на ммоль фосфолипидов. Затем модифицированный антигенный $A\beta$ -пептид добавляли в молярном соотношении пептида и фосфолипидов от 1:30 до 1:200, прежде всего в молярном соотношении от 1:50 до 1:120, более предпочтительно 1:100. Растворители удаляли, например, выпариванием, и образовавшуюся пленку гидратировали стерильным буферным раствором, таким, например, как ЗФР.

Липосомы можно получать также методом инъекции в перекрестном потоке, который описан, например, у Wagner и др., Journal of Liposome Research т.12(3), 2002, сс.259-270. При инъекции липидных растворов в водной буферной системе липиды имеют тенденцию образовывать «осадки (преципитаты)» с последующей самоагрегацией в пузырьки.

Размер полученных пузырьков зависит от таких факторов, как концентрация липида, скорость перемешивания, скорость инъекции и выбор липидов. Предназначенная для получения система может состоять из модуля для инъекции в перекрестном потоке, емкостей для полярной фазы (например, раствор ЗФР-буфера), емкости для этанольного/липидного раствора и устройства для создания давления, но прежде всего устройства для создания давления азота. В то время как водный или полярный раствор нагнетают насосом через модуль для перекрестной инъекции, этанольный/липидный раствор инжектируют в полярную фазу с помощью различных величин прилагаемого давления.

Липосома функционирует также в качестве адъюванта, и пептид, находясь на достаточном удалении от бислоя, может процессироваться индивидуально, и это повышает его иммуногенность по сравнению с пальмитоилированным антигеном.

Свободный конец ПЭГ присоединяют с помощью ковалентной связи к молекуле фосфатидилэтаноламина (где жирная кислота может представлять собой: миристиновую, пальмитиновую, стеариновую, олеиновую кислоту и т.д. или их комбинацию), чтобы он функционировал в качестве «заякоривающего» элемента. Указанную надмолекулярную структуру можно закреплять путем реконструирования в липосомах, состоящих из фосфолипидов и холестерина (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, холестерин в различных молярных соотношениях). Можно применять другие фосфолипиды. Липид А применяют в концентрации примерно 40 мкг/ммоль фосфолипидов.

В определенных вариантах осуществления изобретения пальмитоилированные или пэгилированные надмолекулярные антигенные конструкции содержат пептид, имеющий аминокислотную последовательность β -амилоида. Пептиды могут также содержать или соответствовать полному пептиду амилоида бета и его активным фрагментам.

Кроме того, пептиды, применяемые согласно настоящему изобретению, включают также $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO:2); $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$ (SEQ ID NO:3); $A\beta_{1-15}$ (SEQ ID NO:1); и их активные фрагменты.

Для того чтобы вызывать образование антител и для их получения и для определения иммуногенности антигенной конструкции на основе модифицированного $A\beta$, приемлемое животное, выбранное из группы, включающей мышей, крыс, кроликов, свиней, птиц и т.д., но предпочтительно мышей, прежде всего мышей линии C57BL/6, иммунизируют антигенным пептидом. Иммуногенность антигенной конструкции определяют путем зондирования образцов сыворотки через определенные интервалы времени после иммунизации с помощью иммуноанализа, такого, например, как ELISA.

Моноклональные антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать с помощью классического клонирования и методов клеточного слияния, которые хорошо известны в данной области. Представляющий интерес иммуноген (антиген), как правило, вводят (например, с помощью внутрибрюшинной инъекции) мышам дикого типа или инбредным (например, мышам линии BALB/c или предпочтительно C57BL/6), крысам, кроликам или другим видам животных или трансгенным мышам, которые продуцируют нативные или человеческие антитела. Для индукции иммунного ответа иммуноген можно вводить индивидуально или в смеси с адъювантом или экспрессировать из вектора (вектор репликона VEE, коровья оспа), или в виде ДНК, или в виде слитого белка. Слитые белки содержат пептид, против которого требуется получить иммунный ответ, сшитый с белками-носителями, такими, например, как бета-галактозидаза, глутатион-S-трансфераза, гемоцианин лимфы улитки (KLH) и бычий сывороточный альбумин. В этих случаях пептиды служат в качестве гаптенов с белками-носителями. После ревакцинации животных, например, 2 или более раз, из организма иммунизированных животных получают спленоциты и создают гибридомы путем слияния сенсibilизированных спленоцитов с линией клеток миеломы, такой как линия клеток мышинной миеломы SP2-0 (ATCC, Манассас, шт.Виргиния), с помощью хорошо известных методов, описанных у Kohler и Milstein (Nature 256, 1975, сс.495-497) и Harlow и Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенную конструкцию, предлагаемую в изобретении, прежде всего композицию вакцины, содержащую антигенную конструкцию в фармацевтически приемлемой форме, вводят в виде повторных доз, в частности от 1 до 15 доз, более предпочтительно от 2 до 10 доз, еще более предпочтительно от 3 до 7 доз, но наиболее предпочтительно от 4 до 6 доз, с временными интервалами, составляющими 1-10 недель, прежде всего с временными интервалами, составляющими 1-6 недель, более предпочтительно с временными интервалами, составляющими 1-4 недели, и еще более предпочтительно с временными интервалами от 2 до 3 недель. Иммунный ответ оценивают в полученных образцах сыворотки через приемлемый промежуток времени после ревакцинации, прежде всего через 3-10 дней после ревакцинации, более предпочтительно через 4-8 дней после ревакцинации и более предпочтительно через 5-6 дней после ревакцинации, и определяют иммуногенность антигенной конструкции с помощью известной методологии, прежде всего с помощью одного из обычно применяемых иммуноанализов, таких, например, как ELISA.

Иммунизация антигенной конструкцией, предлагаемой в изобретении, но прежде всего композицией вакцины, которая содержит антигенную конструкцию, предлагаемую в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме, приводит к выраженному

иммунному ответу у обработанного животного. Животных, но прежде всего мышей, у которых обнаружены терапевтические титры, отбирают для слияния продуцирующих антиген клеток, прежде всего В-лимфоцитов, с постоянно растущей или имortalизованной линией клеток, такой как линия клеток миеломы. Слияние клеток индуцируют, добавляя полиэтиленгликоль. Терапевтические титры представляют собой титры, при которых получают положительные результаты с использованием ELISA при разведении от 1:4000 до 1:6000, прежде всего от 1:4500 до 1:5500, более предпочтительно 1:5000.

Затем образовавшиеся гибридные клетки клонируют общепринятым образом, например используя ограничивающее разведение, и культивируют образовавшиеся клоны, которые продуцируют требуемые моноклональные антитела.

Полученные таким образом гибридомы отбирают с помощью химических агентов, высевая клетку в среду для селекции, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT).

Затем гибридомы подвергают скринингу в отношении способности продуцировать моноклональные антитела против специфических ассоциированных с амилоидом заболеваний или нарушений. Гибридомы, продуцирующие представляющие интерес антитела, клонируют, размножают и хранят в замороженном состоянии до дальнейшего применения. Предпочтительные гибридомы продуцируют моноклональное антитело, имеющее изотип IgG, более предпочтительно изотип IgG2.

Поликлональные антитела получают иммунизацией животных, таких как мыши или кролики или любое другое приемлемое животное, описанными выше композициями надмолекулярных антигенных конструкций, предлагаемых в настоящем изобретении. Затем из организма животных получают образцы сыворотки, и антитела в сыворотке подвергают скринингу в отношении реактивности связывания с амилоидным антигеном.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать с помощью известных методов в физиологически приемлемой форме, которая может включать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Например, антитело, предлагаемое в изобретении и описанное выше, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, прежде всего моноклональное антитело, включая любое функционально эквивалентное антитело или его функциональные фрагменты, объединяют с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или эксципиентом с получением терапевтической композиции. Приемлемые фармацевтические носители, разбавители и/или эксципиенты хорошо известны в данной области, и к ним относятся, например, забуференные фосфатом физиологические растворы, вода, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д.

Препаративную форму фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, можно получать с помощью общепринятой методологии, известной специалистам в данной области.

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить индивидууму в твердой, жидкой форме или в виде аэрозоля, которые содержат приемлемую фармацевтически эффективную дозу. Примерами твердых композиций являются пилюли, кремы и имплантируемые стандартные дозы. Пилюли можно вводить орально.

Терапевтические кремы можно наносить местно. Имплантируемые стандартные дозы можно наносить местно, например на область опухоли, или можно имплантировать с целью системного высвобождения терапевтической композиции, например подкожно. Примерами жидких композиций являются препаративные формы, адаптированные для

внутримышечной, подкожной, внутривенной, внутриартериальной инъекции, или препаративные формы для местного или интратрахеального нанесения. Примерами препаративных форм в виде аэрозоля являются применяемые путем ингаляции препаративные формы, предназначенные для введения в легкие.

5 Композиции можно вводить с помощью стандартных путей введения. Как правило, композицию можно вводить с использованием местного, орального, ректального, назального или парентерального (например, внутривенного, подкожного или
10 внутримышечного) пути введения. Кроме того, композицию можно включать в обеспечивающие пролонгированное высвобождение матрицы, например, из биоразложимых полимеров, полимеры можно имплантировать в область, в которую требуется осуществлять введение, например в область опухоли. Метод предусматривает введение однократной дозы, введение повторных доз через предварительно установленные интервалы времени и пролонгированное введение в течение предварительно определенного периода времени.

15 Применяемая в настоящем изобретении матрица, обеспечивающая пролонгированное высвобождение, представляет собой матрицу, изготовленную из материалов, как правило, полимеров, которые расщепляются путем ферментативного или кислотного/щелочного гидролиза или путем растворения. При внесении в организм матрица подвергается воздействию ферментов и общей воды организма. Матрицу,
20 обеспечивающую пролонгированное высвобождение, следует выбирать из биосовместимых материалов, таких как липосомы, полилактиды (полимолочная кислота), полигликолид (полимер гликолевой кислоты), сополимер полилактида и гликолида (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты), полиангидриды, сложные поли(орто)эфиры, полипептиды, гиалуроновая кислота, коллаген,
25 хондротинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Предпочтительная биоразлагаемая матрица представляет собой матрицу из любого следующего материала: полилактид, полигликолид или сополимер полилактида
30 и гликолида (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты).

Как хорошо известно специалистам в данной области, доза композиции должна зависеть от ряда факторов, таких, например, как состояние, подлежащее лечению, конкретная применяемая композиция и другие клинические факторы, такие как вес, размер, пол и общее состояние здоровья пациента, площадь поверхности тела,
35 конкретное соединение или композиция, подлежащая введению, другие одновременно применяемые лекарственные средства и путь введения.

Композицию можно вводить в сочетании с другими композициями, содержащими биологически активную субстанцию или соединение, прежде всего по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, включающей соединения против окислительного
40 стресса, антиапоптозные соединения, хелаты металлов, ингибиторы репарации ДНК, такие как пирензепин и метаболиты, 3-амино-1-пропансульфоновую кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активаторы секретаз, ингибиторы β - и γ -секретаз, таубелки, нейромедиатор, разрушители β -складчатой конформации, противовоспалительные молекулы, «атипичные антипсихотические средства», такие, например, как клозапин,
45 зипрасидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, или ингибиторы холинэстеразы (ChEI), такие как такрин, ривастигмин, донепезил и/или галантамин, и другие лекарственные средства и пищевые добавки, такие, например, как витамин B12, цистеин, предшественник ацетилхолина, лицитин, холин, Ginkgo biloba, ацил-L-карнитин,

идебон, пропентофиллин или производное ксантина, в сочетании с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемым носителем, и/или разбавителем, и/или эксципиентом и в сочетании с процедурами, предназначенными для лечения заболеваний.

- 5 Белковое фармацевтически активное действующее вещество может присутствовать в количестве от 1 нг до 10 мг на дозу. Как правило, схема применения может предусматривать введение от 0,1 мкг до 10 мг антитела, предлагаемого в изобретении, прежде всего от 1,0 мкг до 1,0 мг и более предпочтительно от 1,0 мкг до 100 мкг, при этом все индивидуальные количества, входящие в указанный диапазон, подпадают под
10 объем изобретения. Если введение осуществляют путем непрерывной инфузии, то более приемлемая доза может составлять от 0,01 мкг до 10 мг на килограмм веса тела в ч, при этом все индивидуальные количества, входящие в указанный диапазон, подпадают под объем изобретения.

Введение, как правило, является парентеральным, например, внутривенным.

- 15 Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. К неводным растворителям относятся (но не ограничиваясь ими) пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные растворители можно выбирать из группы, включающей воду,
20 спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Парентеральные наполнители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированный раствор Рингера или жидкие жиры. Наполнители для внутривенного введения представляют собой добавки для восполнения дефицита жидкости или питательных веществ, электролитные
25 добавки (например, на основе декстрозы Рингера) и другие вещества. Могут присутствовать также консерванты, такие, например, как антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и др.

- Фармацевтическая композиция может содержать также белковые носители, такие, например, как сывороточный альбумин или иммуноглобулин, в частности человеческого
30 происхождения. Дополнительные биологически активные агенты могут присутствовать в фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении, в зависимости от назначения.

- Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения являются способы и наборы, предназначенные для выявления и диагностики ассоциированных с амилоидом
35 заболеваний или состояний, для диагностики предрасположенности к ассоциированному с амилоидом заболевания или состояния или для мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента или предсказания чувствительности пациента к лечению с использованием антитела или композиции вакцины, предлагаемых в изобретении и описанных выше. Эти методы включают известные иммунологические
40 методы, которые обычно применяют для выявления и количественной оценки субстанций в биологических образцах или в условиях *in situ*.

- Диагностирование ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния или предрасположенности к ассоциированному с амилоидом заболеванию или состоянию у пациента можно осуществлять путем выявления иммуноспецифического связывания
45 моноклонального антитела или его активного фрагмента с эпитопом амилоидного белка в образце или *in situ*, которое заключается в том, что приводят в контакт образец, или специфическую часть организма, или область организма, которая, как ожидается, может содержать амилоидный антиген, с антителом, которое связывается с эпитопом

амилоидного белка, дают возможность антителу связаться с амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса, выявляют формирование иммунологического комплекса и устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием амилоидного антигена в образце или специфической части или области организма, необязательно осуществляют сравнение количества иммунологического комплекса с количеством комплекса в здоровом контрольном образце, при этом увеличение количества агрегатов по сравнению с количеством в здоровом контрольном образце свидетельствует о том, что пациент страдает или имеет риск развития ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния.

Мониторинг минимальных остаточных признаков заболевания у пациента после лечения антителом или композицией вакцины, предлагаемыми в изобретении, можно осуществлять путем выявления иммуноспецифического связывания моноклонального антитела или его активного фрагмента к эпитопу амилоидного белка в образце или *in situ*, которое заключается в том, что приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, которая, как ожидается, может содержать амилоидный антиген, с антителом, которое связывается с эпитопом амилоидного белка, дают возможность антителу связаться с амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса, выявляют формирование иммунологического комплекса и устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием амилоидного антигена в образце или специфической части или области организма, необязательно осуществляют сравнение количества иммунологического комплекса с количеством комплекса в здоровом контрольном образце, при этом увеличение количества агрегатов по сравнению с количеством в здоровом контрольном образце свидетельствует о том, что пациент еще страдает минимальными остаточными признаками заболевания.

Предсказание чувствительности пациента к лечению с использованием антитела или композиции вакцины, предлагаемых в изобретении, можно осуществлять путем выявления иммуноспецифического связывания моноклонального антитела или его активного фрагмента к эпитопу амилоидного белка в образце или *in situ*, которое заключается в том, что приводят в контакт образец или специфическую часть организма или область организма, которая, как ожидается, может содержать амилоидный антиген, с антителом, которое связывается с эпитопом амилоидного белка, дают антителу связаться с амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса, выявляют формирование иммунологического комплекса и устанавливают корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием амилоидного антигена в образце или специфической части или области организма, необязательно осуществляют сравнение количеств иммунологического комплекса до и после начала лечения, при этом снижение количества агрегатов свидетельствует о том, что существует большая вероятность того, что пациент будет чувствительным к лечению.

Биологические образцы, которые можно применять для диагностики ассоциированного с амилоидом заболевания или состояния, для диагностики предрасположенности к ассоциированному с амилоидом заболеванию или состоянию или для мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента или предсказания чувствительности пациента к лечению с использованием антитела или композиции вакцины, предлагаемых в изобретении и описанных выше, представляют собой, например, жидкости, такие как сыворотка, плазма, слюна, желудочные секреты,

слизистая, спинномозговая жидкость, лимфатическая жидкость и т.п., или образцы клеток или тканей, полученные из организма, такие как нейронная ткань, ткань головного мозга, сердечная или сосудистая ткань. Для выявления присутствия или отсутствия амилоидного антигена в образце можно применять любой иммуноанализ, известный обычному специалисту в данной области (см. Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, сс.555-612), такой, например, как анализы, которые применяют в методах выявления с использованием вторичных реагентов для выявления, ELISA и анализы иммунопреципитации и агглютинации. Подробное описание этих анализов представлено, например, в WO 96/13590 на имя Maertens и Stuyver, Zrein и др., 1998 и в WO 96/29605.

Для установления диагноза *in situ* антитело или его любой активный и функциональный фрагмент можно вводить в организм, подлежащий диагностированию, с помощью методов, известных в данной области, таких, например, как внутривенная, внутриназальная, внутрибрюшинная, внутривентрикулярная, внутриартериальная инъекция, так, чтобы могло произойти специфическое связывание антитела, предлагаемого в изобретении, с эпитопной областью на амилоидном антигене. Комплекс антитело/антиген можно выявлять путем присоединения метки к антителу или его функциональному фрагменту.

Иммуноанализы, применяемые в диагностике или применяемые для диагностики предрасположенности к ассоциированному с амилоидом заболеванию или состоянию или для мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента или предсказания чувствительности пациента к лечению с использованием антитела или композиции вакцины, предлагаемых в изобретении и описанных выше, как правило, основаны на применении меченых антигенов, антител или вторичных реагентов, предназначенных для обнаружения. Эти белки или реагенты можно метить с помощью соединений, как правило, хорошо известных специалистам в данной области, таких как ферменты, радиоактивные изотопы и флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные субстанции, включая окрашенные частицы, такие как коллоидное золото и гранулы из латекса. Среди указанных методов мечение с помощью радиоактивных изотопов можно применять практически во всех типах анализов и с наибольшим количеством вариаций. Конъюгированные с ферментами метки являются особенно предпочтительными, когда требуется избежать применения радиоактивности или когда требуется быстрое получение результатов. Флуорохромы, хотя для их применения требуется дорогостоящее оборудование, обеспечивают очень чувствительный метод обнаружения. Антитела, применяемые в этих анализах, представляют собой моноклональные антитела, поликлональные антитела и поликлональные антитела, очищенные на основе аффинности.

В другом варианте антитело можно метить косвенно путем взаимодействия с мечеными субстанциями, которые обладают аффинностью к иммуноглобулину, такими как протеин А или G или вторичные антитела. Антитело можно конъюгировать с вторичной субстанцией и выявлять с помощью меченой третьей субстанции, которая обладает аффинностью ко второй субстанции, конъюгированной с антителом. Например, антитело можно конъюгировать с биотином и конъюгат антитело-биотин выявлять с помощью меченого авидина или стрептавидина. Аналогично этому антитело можно конъюгировать с гаптенем и конъюгат антитело-гаптен выявлять с помощью меченого антитела к гаптenu.

Специалистам в данной области должны быть хорошо известны указанные и другие приемлемые метки, которые можно применять согласно настоящему изобретению.

Связывание этих меток с антителами или их фрагментами можно осуществлять с помощью стандартных методов, как правило, известных обычным специалистам в данной области. Общепринятые методики описаны у Kennedy J. H. и др., Clin. Chim. Acta 70, 1976, сс.1-31; и у Schurs A. H. W. M. и др., Clin. Chim Acta 81, 1977, сс.1-40.

5 Упомянутые в последней ссылке методы сочетания представляют собой методы на основе глутарового альдегида, метод на основе периодата, метод на основе дималеимида и т.д., все они включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В современных иммуноанализах применяют метод, основанный для использования двойных антител, для выявления присутствия анализируемого вещества, при котором антитело метят косвенно путем реактивности со вторым антителом, которое
10 предварительно метят выявляемой меткой. Второе антитело предпочтительно представляет собой антитело, которое связывается с антителами животного, из которого моноклональное антитело получено. Другими словами, если моноклональное антитело представляет собой мышинное антитело, то меченое второе антитело представляет собой
15 антимышиное антитело. Для моноклонального антитела, предназначенного для применения в описанном ниже анализе, эта метка предпочтительно представляет собой сенсibilизированную антителом гранулу, предпочтительно магнитную гранулу. Для поликлонального антитела, предназначенного для применения в иммуноанализах, представленных в настоящем описании, метка предпочтительно представляет собой
20 выявляемую молекулу, такую как радиоактивная, флуоресцентная или электрохемилуминисцентная субстанция.

Согласно настоящему изобретению можно применять также альтернативную систему, основанную на использовании двойных антител, которую часто называют системами быстрого формата, поскольку они адаптированы к быстрому выявлению присутствия
25 анализируемого вещества. Для этой системы требуется высокая аффинность антитела и анализируемого вещества. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения присутствие амилоидного антигена определяют с использованием пары антител, каждое из которых специфично для амилоидного антигена. Одно из указанной пары антител обозначают в контексте настоящего описания как «идентифицирующее
30 антитело», а второе из указанной пары антител обозначают в контексте настоящего описания как «иммобилизованное антитело». Моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять как в качестве иммобилизованного антитела, так и в качестве идентифицирующего антитела. Моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять также в качестве и
35 иммобилизованного, и идентифицирующего антитела в одном анализе. Таким образом, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является применение сэндвич-анализа с использованием двойного антитела для выявления амилоидного антигена в образце биологической жидкости. В этом анализе анализируемое вещество (амилоидный антиген) помещают посередине между идентифицирующим антителом и
40 иммобилизованным антителом, при этом иммобилизованное антитело обратимо иммобилизовано на твердой подложке. Идентифицирующее антитело должно содержать выявляемую метку, предназначенную для идентификации присутствия сэндвича антитело-анализируемое вещество и, как следствие, присутствия анализируемого вещества.

45 Примерами твердофазных субстанций являются (но не ограничиваясь ими) титрационные микропланшеты, лабораторные пробирки из полистирола, магнитные, пластиковые или стеклянные гранулы и предметные стекла, которые хорошо известны в области радиоиммуноанализов и иммуноферментных анализов. Методы сочетания

антител с твердыми фазами хорошо известны специалистам в данной области. В последние годы целый ряд пористых материалов, таких как нейлон, нитроцеллюлоза, ацетат целлюлозы, стеклянные волокна и другие пористые полимеры, начали применять в качестве твердых подложек.

Настоящее изобретение относится также к диагностическому набору, предназначенному для выявления амилоидного антигена в биологическом образце, который содержит указанную выше композицию. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанному диагностическому набору, который помимо указанной выше композиции содержит также реагент для выявления, описанный выше. Понятие «диагностический набор» относится в целом к любому диагностическому набору, известному в данной области. Более конкретно последнее понятие относится к диагностическому набору, описанному у Zrein и др., 1998.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются новые иммунозонды и тест-наборы, предназначенные для выявления и диагностики ассоциированных с амилоидом заболеваний и состояний, которые содержат антитела, предлагаемые в настоящем изобретении. Для получения иммунозондов антитела прямо или косвенно присоединяют к приемлемой репортерной молекуле, например ферменту или радионуклиду. Тест-набор включает контейнер, который содержит одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, и инструкции по применению антител для целей связывания с амилоидным антигеном с получением иммунологического комплекса и выявления формирования иммунологического комплекса, при этом присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием амилоидного антигена.

Примеры

Антигены, применяемые для получения мышинных моноклональных антител

Таблица 1				
Антитела и антигенные конструкции, применяемые для получения указанных антител				
Мышиное МАт	Антиген/последовательность	Линкер	Якорь	Адъювант
mACI-01-Ab7	A β ₁₋₁₆	ПЭГ	DSPE	Липид А
mACI-02-Ab6	A β ₁₋₁₆ (Δ 14)	ПЭГ	DSPE	Липид А
mACI-11-Ab9	A β ₂₂₋₃₅	ПЭГ	DSPE	Липид А
mACI-12-Ab11	A β ₂₉₋₄₀	ПЭГ	DSPE	Липид А
mACI-24-Ab4	A β ₁₋₁₅	-	Palm	Липид А

Пример 1: Способы получения пальмитоилированных надмолекулярных антигенных конструкций, содержащих A β ₁₋₁₅

Синтез антигенного тетра(пальмитоилизин)-A β ₁₋₁₅-пептида

Пальмитоилированный амилоидный 1-15-пептид синтезировали с помощью усовершенствованного описанного ранее метода (Nicolau и др., 2002). Указанный новый подход включает прививку на смоле пальмитиновой кислоты с концевыми остатками Lys ранее полученного пептида вместо ступенчатого твердофазного синтеза, посредством которого включают модифицированную 9-флуоренилметоксикарбонил-аминокислоту (Fmoc)-Lys(Pal)-ОН. Этот новый подход увеличивает эффективность сочетания и позволяет получать продукт существенно более высокой чистоты. Так, ортогонально защищенную аминокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН присоединяли к смоле

Ванга с помощью синтеза, основанного на сочетании с использованием гексафторфосфата 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия (ГБТУ). Fmoc-группу удаляли с помощью 20%-ного пиперидина в ДМФ и осуществляли сочетание с вторым остатком Fmoc-Lys(Mtt)-ОН. Затем общепринятый автоматический пептидный синтез с использованием Fmoc/tBu-химии и общепринятые защитные группы боковых цепей применяли для сочетания следующих 15 аминокислот с получением пептидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1. И, наконец, осуществляли сочетание последних двух аминокислот Fmoc-Lys(Mtt)-ОН. Затем Mtt-группы избирательно расщепляли с помощью 1% трифторуксусной кислоты (ТФК) в дихлорметане и после этого осуществляли сочетание с пальмитиновой кислотой с использованием ГБТУ. После промывки смолы Fmoc-группу удаляли с помощью 20%-ного пиперидина в диметилформамиде (ДМФ) и одновременно окончательно расщепляли смолу и удаление защитных групп боковых цепей осуществляли с помощью ТФК в стандартных условиях. После растирания в холодном простом диэтиловом эфире получали продукт в виде твердого вещества белого цвета. С помощью масс-спектрометрии с использованием электроспрея подтверждали идентичность продукта (ожидаемая величина m/z : 1097,9 ($[M]3+$); обнаруженная: 1096,8 ($[M-3H]3+$), при этом не обнаружено никаких других три-, ди- или монопальмитоилированных пептидов.

Пример 2: Способы получения надмолекулярных антигенных конструкций

Синтез пэгилированного антигенного β -амилоидного пептида

Для усиления иммунного ответа другой якорь/спейсер применяли для реконструкции пептида в липосоме, например полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ присоединяли с помощью ковалентной связи к обоим концам пептида. Другой конец цепи (ПЭГ, $n=70$) ковалентно связывали с фосфатидилэтаноламином (ФЭА), функционирующим в качестве элемента для «заякоривания» в бислое липосомы. Таким образом, липосома начинала функционировать в качестве адъюванта, и пептид, находясь на достаточном удалении от бислоя, мог процессироваться индивидуально, что повышало его иммуногенность по сравнению с пальмитоилированным антигеном.

Надмолекулярные конструкции, представленные в настоящем описании, синтезировали индивидуально с использованием стандартного метода защиты боковых цепей аминокислот с помощью Fmoc/tBu. Как правило, пэгилирование пептидов приводит к получению смесей региоизомеров. В настоящем описании продемонстрирован удобный метод сайтспецифического присоединения конъюгата ПЭГ-липид к С-, так и к N-концу $A\beta$ с использованием частично защищенных пептидов.

Для пептидных последовательностей, которые содержат внутри цепи остатки Lys или His (1-16, 1-16(Δ 14), 22-35), к каждому концу добавляли ортогонально защищенный Lys(ivDde). Дополнительный Gly добавляли к С-концу для облегчения синтеза. Fmoc-группу удаляли с помощью 20%-ного пиперидина в ДМФ и осуществляли N-ацетилирование с помощью уксусного ангидрида. Для избирательного расщепления ivDde-групп использовали обработку 3%-ным гидратом гидразина в ДМФ в течение 1 ч. Для этой цели 2-хлортритильная смола является более предпочтительной по сравнению с более широко применяемой смолой Ванга, поскольку она является существенно более устойчивой к гидразинолизу. Кроме того, 2-хлортритильная смола обладает очень высокой чувствительностью к кислотам и в результате, в отличие от смолы Ванга, позволяет осуществлять выделение защищенных пептидов. Естественно, необходимо осуществлять реакцию сочетания в фазе раствора, поскольку сочетание связанного со смолой пептида с предварительно активированным пэгилированным липидным реагентом DSPE-TDr-SPA не приводит к получению какого-либо продукта

сочетания. Таким образом, избирательное отщепление от смолы в мягких условиях (уксусная кислота/трифторэтанол/дихлорметан, 1:1:8, 1 ч, КТ) позволяло получать пептиды с внутренними защитными группами.

Реакции сочетания в фазе раствора позволяли успешно получать пептид, выведенный из последовательности A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO:2), с использованием DSPE-ПЭГ-SPA в ДМСО и избытка основания. Затем реакции прекращали, добавляя избыток этаноламина в течение 2 ч, и раствор лиофилизировали.

Для последовательности 29-40 не требовалось применения стратегии специальной защиты.

После очистки с помощью ЖХВР (полупрепаративная, с обращенной фазой, колонка C₄) получали N- и C-концевые конъюгаты ПЭГ-липид, имеющие чистоту 50-70%, идентичность которых подтверждали с помощью MALDI (масс-спектрометрия с использованием опосредуемой матрицей лазерной десорбции/ионизации). Для каждой последовательности обнаружены существенные вариации с позиций легкости осуществления реакции сочетания и условий, которые соответственно регулировали (температура, количество молярных эквивалентов DSPE-FOr-SPA, продолжительность). Для удаления избытка DSPE-FDr-SPA из требуемого продукта применяли очистку с помощью ЖХВР. Разделение продуктов, полученных в результате одного и двух сочетаний, перед конечной стадией удаления защитных групп можно осуществлять с помощью катионообменной хроматографии. Последующее удаление защитных групп боковой цепи и отделение избытка DSPE-ПЭГ-SPA после прекращения реакции позволяло выделять требуемые конъюгаты с приемлемой степенью чистоты.

Указанный подход синтеза β -амилоидных антигенов с N- и C-концевыми конъюгатами липид-ПЭГ с использованием защищенных пептидов применим к широкому разнообразию пептидных последовательностей.

Пример 3: Антитела, к образованию которых приводит обработка надмолекулярными антигенными конструкциями

3.1 Получение МАт к надмолекулярной антигенной конструкции, содержащей пальмитоилированный A β ₁₋₁₅

Пальмитоилированный антиген (ACI-24, A β ₁₋₁₅) применяли для иммунизации мышей линии C57BL/6, которую осуществляли с двухнедельными интервалами. Каждым антигеном иммунизировали по 10-12 животных (применяемый для инъекции объем, содержащий 8 нмоль пептида, составлял 200 мкл). Последнюю инъекцию осуществляли за 4 дня до умерщвления животных. После 5 ревакцинаций мышей, у которых обнаружены терапевтические титры (когда разведение сыворотки 1:5000 давало положительную реакцию по данным ELISA), отбирали для слияния. Из организма иммунизированных животных получали спленоциты и создавали гибридомы путем слияния сенсibilизированных спленоцитов с линией клеток миеломы. Слияние мышинных селезеночных В-лимфоцитов осуществляли с линией клеток миеломы SP2-0 (ATCC, Манассас, шт.Виргиния) с помощью хорошо известных методов, описанных у Kohler и Milstein (Nature 256, 1975, cc.495-497) и Harlow и Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

Клетки индуцировали к слиянию, добавляя полиэтиленгликоль. Затем образовавшиеся гибридные клетки клонировали общепринятым образом в течение 10-14 дней, позволяя клонам расти. Для первоначальной селекции клонов использовали ограничивающее разведение. Продуцирующие IgG клоны гибридомы отбирали и оценивали в отношении специфического связывания с A β ₁₋₄₂-пептидом с помощью ELISA, и образовавшиеся

клоны, которые продуцировали требуемые моноклональные антитела, культивировали.

Полученные таким образом гибридомы отбирали с помощью химических агентов, высевая клетки в среду для селекции, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (НАТ).

Затем гибридомы подвергали скринингу в отношении способности продуцировать моноклональные антитела против специфических ассоциированных с амилоидом заболеваний или нарушений. После идентификации маточного клона его пересевали 4 раза для гарантии моноклональности и давали гибриду стабилизироваться.

Гибридомы, продуцирующие представляющие интерес антитела, клонировали, размножали и хранили в замороженном состоянии до дальнейшего применения.

Определяли изотип антител с помощью поступающего в продажу набора для определения изотипов мышинных моноклональных антител и стабильные клоны адаптировали к бессывороточной среде и помещали в биореактор для производства антител.

Предпочтительная гибридома продуцировала моноклональное антитело, имеющее изотип IgG, более предпочтительно изотип IgG1.

3.2 Получение МАт к надмолекулярным антигенным конструкциям, содержащим пэгилированные ПЭГ-Аβ₁₋₁₅, -Аβ₄₋₁₁ и -Аβ₂₉₋₄₀

Липосомные антигены получали согласно методу, описанному у Nicolau и др., PNAS, 99, 2002, сс.2332-2337). Последовательности ПЭГ-Аβ₁₋₁₅, -Аβ₄₋₁₁ и -Аβ₂₉₋₄₀ (фиг.1)

реконструировали в конструкции, представляющей собой липосомы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), димиристоилфосфатидилэтаноламина (DMPEA), димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG) и холестерина (молярные соотношения 0,9:0,1:0,1:0,7), которые содержали монофосфорильный липид А в концентрации 40 мг/мМ фосфолипидов. Эти антигены и пэгилированный Аβ₁₋₁₆

применяли для иммунизации мышей линии C57BL/6 с 2-недельными интервалами. Каждым антигеном иммунизировали 10-12 животных. После 3-6 ревакцинаций мышей, у которых обнаружены терапевтические титры (когда разведение сыворотки 1:5000 давало положительную реакцию по данным ELISA), отбирали для слияния. Из организма иммунизированных животных получали спленоциты и создавали гибридомы путем слияния сенсibilизированных спленоцитов с линией клеток миеломы. Слияние мышинных селезеночных В-лимфоцитов осуществляли с линией клеток миеломы SP2-0 (ATCC, Манассас, шт.Виргиния) с помощью хорошо известных методов, описанных у Kohler и Milstein (Nature 256, 1975, сс.495-497) и Harlow и Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

Клетки индуцировали к слиянию, добавляя полиэтиленгликоль. Образовавшиеся гибридные клетки затем клонировали общепринятым образом, например, используя ограничивающее разведение. Отбирали продуцирующие IgG клоны гибридомы и оценивали в отношении специфического связывания с Аβ₁₋₄₂-пептидом с помощью ELISA, и образовавшиеся клоны, которые продуцировали требуемые моноклональные антитела, культивировали.

Полученные таким образом гибридомы отбирали с помощью химических агентов, высевая клетки в среду для селекции, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (НАТ).

Затем гибридомы подвергали скринингу в отношении способности продуцировать моноклональные антитела против специфических ассоциированных с амилоидом заболеваний или нарушений. Гибридомы, продуцирующие представляющие интерес

антитела, клонировали, размножали и хранили в замороженном состоянии до дальнейшего применения. Предпочтительные гибридомы продуцировали моноклональное антитело, имеющее изотип IgG, более предпочтительно изотип IgG1.

Пример 4: Специфичность распознавания амилоидов антителом mACI-24-Ab4

Для анализа специфичности антитела ACI-24-Ab4 различные концентрации предварительно полученных фибрилл амилоида 1-42, 1-40 и 1-38 блоттировали на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL (фирма Amersham Biosciences). После блокады 10%-ным сухим молоком и 0,7% Твин 20 мембраны инкубировали с первичным антителом в концентрации 20 мкг/мл в течение 2 ч при КТ. После отмывки мембраны инкубировали с конъюгированным с пероксидазой из хрена овечьим антимышиным антителом изотипа IgG (фирма Amersham Biosciences) в течение 1 ч при КТ, отмывали и инкубировали с хемилюминесцентным раствором с последующим экспонированием мембраны на рентгеновскую пленку.

Для оценки связывания МАт (mACI-24-Ab4) с волокнами амилоида β 1-42 предварительно формировали в течение 7 дней при 37°C волокна $A\beta$ 1-42, 1-40 и 1-38 и блоттировали на мембрану. Для оценки способности к связыванию использовали 20 мкг/мл антитела и связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с пероксидазой из хрена овечьего антимышиного антитела изотипа IgG при 20-минутной экспозиции.

Как можно продемонстрировать с помощью дот-блот-анализа, связывание антитела mACI-24-Ab4 с различными предварительно полученными волокнами $A\beta$ характеризовалось различной чувствительностью. Антитело проявляло наибольшую чувствительность к связыванию с волокнами $A\beta_{1-42}$ по сравнению с волокнами $A\beta_{1-40}$ или $A\beta_{1-38}$. Оно обладало способностью обнаруживать по меньшей мере 0,001 мкг волокон $A\beta_{1-42}$, в то время как предел обнаружения антителом волокон $A\beta_{1-40}$ составлял по меньшей мере 0,1 мкг, а волокон $A\beta_{1-38}$ - 1 мкг, это означает, что чувствительность в отношении этих типов амилоидных волокон в 100-1000 раз ниже. Эти данные демонстрируют, что антитело ACI-24-Ab4 обладало по меньшей мере в 100 раз более высокой чувствительностью в отношении амилоидной формы (1-42), которая, как известно, становится нерастворимой в результате изменения вторичной конформации и представляет собой основную часть амилоидных бляшек в головном мозге страдающих AD пациентов.

Пример 5: Связывание АС-иммунного моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 с различными видами амилоидов при анализе методами Вестерн-блоттинга и дот-блоттинга

Для решения вопроса о том, зависит ли связывание мышинового антитела mACI-01-Ab7 C2 от нативной конформации $A\beta$, осуществляли сравнительный анализ связывания линеаризованного амилоида с помощью Вестерн-блоттинга или нативного амилоида с помощью дот-блоттинга (фиг.2а и 2б).

Амилоидные мономеры получали путем растворения $A\beta_{1-42}$ -пептида в HFIP и выпаривания растворителя в атмосфере аргона. Высушенную пептидную пленку хранили при -80°C до применения. Для получения мономеров пептидную пленку ресуспендировали в ДМСО до концентрации 2,75 мкг/мкл и разводили ЗФР до 1 мкг/мкл. Для получения олигомеров высушенную пептидную пленку ресуспендировали в ДМСО до концентрации 5 мМ, облучали ультразвуком и добавляли ЗФР до получения концентрации амилоида 400 мкМ после добавления ДСН до конечной концентрации 0,2%. После инкубации в течение 6 ч при 37°C амилоид разводили водой до конечной

концентрации 100 мкМ и инкубировали в течение еще 18 ч при 37°C. Амилоидные олигомеры осаждали с помощью охлажденного на льду 33%-ного метанола, 4%-ного раствора уксусной кислоты в течение 1 ч при 4°C, центрифугировали при 16200×g в течение 10 мин и дебрис ресуспендировали в 5 мМ Na₂H₂PO₄, 35 мМ NaCl, pH 7,4 до

конечной концентрации 1 мкг/мкл. Для получения волокон пептидную пленку разводили 50 мМ Трис-HCl-буфером, получая концентрацию амилоида 1 мг/мл, и инкубировали при 37°C в течение 5 дней. Пробирки центрифугировали при 10000×g в течение 5 мин и дебрис ресуспендировали в 0,1М карбонатном буфере, pH 9,6 до достижения концентрации 1 мкг/мкл.

Разводили 1 или 5 мкг мономеров, олигомеров или волокон в 3ФР и в буфере для загрузки и вносили в 12% ДСН-ПААГ, и переносили гели на нитроцеллюлозные мембраны. В другом варианте по 3 или 1 мкг/мкл или 100 и 10 нг различных видов амилоидов разводили в 3ФР и наносили точками непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану и мембрану сушили при КТ в течение 1 ч. После блокады в течение 30 мин с использованием раствора казеина (фирма Vector) мембраны инкубировали в течение 30 мин с антителами mACI-01-Ab7 C2 или 6E10 (фирма Chemicon), разведенными до концентрации 1 мкг/мл раствором казеина. После трех отмывок в растворе казеина мембраны инкубировали при КТ в течение 30 мин с меченым с помощью HRP козым антимышиным IgG (фирма Dako Cytomation), разведенным раствором казеина, промывали трижды и осуществляли реакцию с использованием субстрата DAB (фирма Dako Cytomation).

При оценке с помощью дот-блоттинга моноклональное мышинное антитело mACI-01-Ab7 C2 специфически связывалось с мономерами, олигомерами и волокнами аналогично антителу 6E10, которое применяли в качестве положительного контроля. В противоположность этому антитело mACI-01-Ab7C2 не выявляло линеаризованные виды амилоидов при анализе методом Вестерн-блоттинга в отличие от антитела 6E10, которое эффективно распознавало линеаризованные пептиды. Этот результат демонстрирует, что связывание mACI-01-Ab7 C2 с амилоидом зависит от нативной конформации амилоида.

Пример 6: Взаимодействие mACI-01Ab7 C2 -Aβ₁₋₄₂

Взаимодействие полученного в результате развития иммунитета к АС (амилоиду в определенной конформации) антитела mACI-01-Ab7 C2 (тС2) с амилоидным пептидом изучали с помощью резонанса поверхностного плазмона. Оценивали связывание мышинного антитела mACI-01-Ab7 C2 либо с мономерами, либо с фибриллами Aβ₁₋₄₂.

Все эксперименты на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) осуществляли с помощью устройства Biacore X (фирма Biacore AB). Реагенты для иммобилизации (EDC, NHS и этаноламин), сенсорные чипы CM5 и SA, а также рабочий буфер и буфер для образца HBS-EP получали от фирмы Biacore AB. В качестве буфера для сочетания использовали ацетат натрия (10 мМ, pH 5,0) для повышения выхода реакции сочетания. Фибриллярный Aβ₁₋₄₂ (фирма Bachem) получали, добавляя 3ФР-буфер к Aβ₁₋₄₂ до конечной концентрации 3 мг/мл и выдерживали в пробирках при 37°C в течение 7 дней. Фибриллярный Aβ₁₋₄₂ сшивали с сенсорным чипом CM5, с поверхностью которого был связан карбоксиметилдекстрановый матрикс. Биотинилированный мономерный Aβ₁₋₄₂ (фирма Bachem) сшивали с сенсорным чипом SA, содержащим карбоксиметилдекстрановый матрикс с присоединенным с помощью ковалентной связи стрептавидином. Как правило, анализировали 4 или 5 концентраций МАт, полученных серийным разведением в рабочем буфере. Инъекции осуществляли начиная с наименьшей

концентрации и пропускали и через проточную ячейку (пя) 1, и через 2 при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 мин. Проточная ячейка 2 была недериватизированной, и ответы вычитали из данных, полученных в проточной ячейке 1, для внесения поправки на шум устройства и значительные изменения преломляющей среды. После завершения инъекции поверхности немедленно отмывали рабочим буфером в течение 5 мин. Для отделения оставшегося связанного антитела от волокон $A\beta_{1-42}$ осуществляли регенерацию поверхности путем импульсных инъекций 10 мМ NaOH. Кинетический анализ осуществляли с использованием алгоритма численной интеграции и глобального анализа, используя VBAevaluation 3.0. Кривые, полученные при инъекциях различных концентраций анализируемого вещества, совмещали и основные линии принимали за ноль. При аппроксимации кривыми все данные подгоняли одновременно к гомогенному комплексу 1:1.

Установлено, что связывание мышинового антитела mACI-01-Ab7 C2 с амилоидом, оказалось относительно сильным. Как видно из таблицы 2, специфическое связывание мышинового антитела mACI-01-Ab7 C2 с иммобилизованными $A\beta_{1-42}$ -фибриллами характеризовалось средними значениями константы ассоциации (k_a) $3,8 \times 10^{-4}$ М/с и константы диссоциации (k_d) $1,1 \times 10^{-3}$ с⁻¹ и, как следствие, полученным средним значением KD $3,5 \times 10^{-8}$ М. Ассоциация mACI-01-Ab7 C2 с мономерами $A\beta$ была аналогичной или несколько более быстрой и характеризовалась средним значением k_a $1,6 \times 10^{-4}$ М/с, но диссоциация была существенной более быстрой и характеризовалась значением KD $2,5 \times 10^{-7}$ М.

Таблица 2

	Мономеры			Волокна		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
mACI-01-Ab7 C2, эксп.1	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
mACI-01-Ab7 C2, эксп.2	1,5E+04	5,3E-03	3,5E-07	5,6E+04	9,66E-04	1,73E-08
mACI-01-Ab7 C2, эксп.3				3,2E+04	1,49E-03	4,58E-08
среднее	1,6E+04	4,0E-03	2,5E-07	3,8E+04	1,1E-03	3,5E-08
значение для mACI-01-Ab7 C2	$\pm 0,21$	$\pm 1,84$	$\pm 1,41$	$\pm 1,66$	$\pm 0,3$	$\pm 1,53$

Пример 7: Связывание моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 с амилоидными волокнами

Анализ молекулярного связывания антитела с боковыми ветвями ранее сформированных волокон осуществляли с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ТЭМ) с отрицательной контрастностью (фиг.3а и 3б).

Антитело mACI-01-Ab7 C2 сшивали с частицами коллоидного золота размером 8 нм согласно методу, описанному в 4,5. Для совместной инкубации с волокнами амилоида 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 6,65 мкМ волокон инкубировали в течение 24 ч при КТ с меченым золотом антителом в молярном соотношении 1:100. Затем 5 мкл образца инкубировали в течение 45 с на медной сетке (меш 200), покрытой пленкой из парлодия/С, которую непосредственно перед этим подвергали электролюминесценции, трижды промывали

водой и один раз 2%-ным свежеразбавленным и профильтрованным уранилацетатом. Образцы окрашивали 2%-ным уранилацетатом в течение 15-20 с. Избыток красителя на решетках отсасывали и затем сушили на воздухе. Готовили по три сетки для каждого образца. Сетки анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа

Моноклональное антитело mACI-01-Ab7 C2 связывалось непосредственно с $A\beta_{1-42}$ -волоконками. Важно отметить, что антитело связывалось несимметрично относительно оси отдельных волокон, а связывалось с конкретными, но не со всеми областями боковых ветвей каркаса волокон. Вероятно, мишенью для антитела являются специфические области в боковых ветвях. Возможным объяснением этого факта является специфическая вторичная структура, которая присутствует только в этих конкретных боковых ветвях. Эта гипотезу подтверждали с помощью ЯМР-данных, которые демонстрируют, что антитело индуцирует переход конформации и поэтому его связывание, по-видимому, зависит от конформации амилоидного волокна, имеющего β -складчатую структуру.

Пример 8: Фракционирование путем ультрацентрифугирования в градиенте плотности. Способность моноклональных антител ингибировать полимеризацию $A\beta_{1-42}$ -волокон и нарушать агрегацию $A\beta_{1-42}$ -волокон оценивали с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности (Rzepecki и др., 2004), которое основано на принципе распределения имеющих различный размер пептидных волокон после инкубации с добавлением антител или без антител с последующим анализом продуктов седиментации с помощью ДСН-ПААГ на предварительно созданном градиенте (OptiPrep™). Очевидным преимуществом такого метода является одновременный анализ популяции предварительно сформированных $A\beta$ -волокон, способности совместно инкубированных антител нарушать агрегацию и ингибировать агрегацию, а также связывания антител с волокнами.

Все моноклональные антитела к $A\beta_{1-16}$ (mACI-01-Ab7 C2), $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$ (mACI-02-Ab6), $A\beta_{1-15}$ (mACI-24-Ab4), $A\beta_{22-35}$ (mACI-11-Ab9) и $A\beta_{29-40}$ (mACI-12-Ab11) анализировали в отношении способности нарушать агрегацию, в то время как способность ингибировать агрегацию изучали только для антител mACI-02-Ab6, mACI-24-Ab4 и mACI-01-Ab7 C2.

Для ингибирования агрегации $A\beta_{1-42}$ инкубировали мономеры $A\beta_{1-42}$ с МАт в двух различных молярных соотношениях (молярное содержание мономера $A\beta_{1-42}$ в 30-100 раз выше, чем МАт) при использовании конечной концентрации Ар 50 мкМ. После инкубации в течение 24 ч при 37°C образцы наслаивали на прерывистый градиент Optiprep™ и пробирки вращали при 259000xg в течение 3 ч при 4°C. Собирали 15 фракций (по 140 мкл каждая), фракция 1 представляла собой фракцию с наименьшей плотностью, полученную на вершине градиента, а фракция 15 представляла собой наиболее плотную фракцию, полученную в нижней части (на дне) градиента. Собирали также дебрис. Объединенные фракции анализировали с помощью ДСН-ПААГ с окрашиванием серебром. Для анализов ингибирования использовали концентрацию $A\beta_{1-42}$, которая была в 5 раз ниже, чем для анализов нарушения агрегации, что позволяло снижать кинетику амилоидной агрегации и проводить измерения в пределах линейной фазы.

Для анализа нарушения агрегации ранее сформированных $A\beta_{1-42}$ -фибрилл при совместной инкубации с МАт (при двух различных молярных соотношениях 1:30 и 1:100, МАт + мономер $A\beta_{1-42}$ при конечной концентрации $A\beta$ 246 мкМ) осуществляли

инкубацию образцов в течение 24 ч при 37°C. Через 24 ч образцы фракционировали ультрацентрифугированием и разделяли с помощью ДСН-ПААГ согласно описанному выше и разработанному ранее методу (Rzepecki и др., 2004).

8.1. Анализ ингибирования агрегации A β ₁₋₄₂

Было установлено, что без добавления МАт агрегация A β -пептида происходила после 24-часовой инкубации и наибольшее количество белка было обнаружено во фракциях 13-15, что свидетельствовало о полной полимеризации мономеров A β -пептида. Успешное и существенное ингибирование агрегации должно приводить к образованию фибрилл меньшего размера или полимерного растворимого белка β -амилоида (A β), которые должны присутствовать во фракциях с более низкой плотностью (10-13). Именно такой сдвиг полос можно выявить при анализе агрегации при использовании mACI-01-Ab7 C2, что свидетельствует о распределении A β -пептида во фракциях 11, 12 и 13.

Это было подтверждено во втором эксперименте, в котором установлено, что mACI-01-Ab7 C2 также вызывало сдвиг большинства полос (наиболее интенсивная полоса) от 14 к 13 фракции и приводило к выраженной солюбилизации полос во фракциях от 14 до дебриса. Эти результаты свидетельствуют о том, что mACI-01-Ab7 C2 обладает выраженной способностью ингибировать полимеризацию мономеров A β -пептида с образованием волокон и свидетельствуют о специфическом связывании с A β -волоконками (во фракции 13).

Аналогичные данные получены при использовании антител mACI-24-Ab4 и mACI-02-Ab6. Без добавления МАт агрегация A β -пептида происходила после 24-часовой инкубации и наибольшее количество белка было обнаружено во фракциях от 13 до дебриса (дебрис, очень небольшое количество во фракции 12), что свидетельствовало о полной полимеризации мономеров A β -пептида. Успешное и существенное ингибирование агрегации должно приводить к образованию волокон меньшего размера или полимерного растворимого белка амилоида β (A β), которые должны присутствовать во фракциях с более низкой плотностью. При анализе агрегации установлено, что антитело mACI-24-Ab4 вызывало сдвиг большинства полос (наиболее интенсивная полоса) от 13 к 11 фракции и 12 и приводило к выраженной солюбилизации полос во фракциях от 13 до дебриса, в то время как mACI-02-Ab6 вызывало сдвиг полос от 13 к 10 фракции, но также полностью ингибировало образование более крупных волокон (находящихся во фракциях с 13 до дебриса). Эти результаты свидетельствуют о том, что и mACI-24-Ab4, и mACI-02-Ab6 обладают выраженной способностью ингибировать полимеризацию мономеров A β -пептида с образованием волокон и свидетельствуют о специфическом связывании с волокнами A β (во фракциях 11 и 12).

В противоположность этому анализ агрегации с использованием mACI-11-Ab9 в молярном соотношении 1:30 продемонстрировал наличие более крупных агрегатов во фракциях с 12 по 15 и в дебрисе. В присутствии mACI-12-Ab11 в молярном соотношении 1:30 агрегаты обнаружены во фракциях с 11 по 15 и дебрисе, но наиболее сильный сигнал обнаружен во фракциях 11 и 12. Это означает, что mACI-01-Ab7 C2 и mACI-24-Ab4 обладают более выраженной способностью ингибировать полимеризацию мономеров A β -пептида с образованием волокон. mACI-12-Ab11 обладало существенно более низкой ингибирующей активностью, чем mACI-01-Ab7 C2, для получения этой слабой ингибирующей активности требуется в три раза более высокое молярное соотношение. Небольшое ингибирование можно обнаружить также при сравнении с mACI-11-Ab9, которое не обладало способностью ингибировать агрегацию волокон A β -пептида. Все МАт характеризуются специфическим связыванием с волокнами A β

(mACI-01-Ab7 C2 во фракциях 11+12; mACI-11-Ab9 во фракции 12 и слабое связывание во фракции 13; mACI-12-Ab11 во фракциях 11 и 12).

Во всех анализах ингибирования пептид был обнаружен в нижних фракциях. Несвязанное МАт (37 кДа, 95 кДа и более 120 кДа), вероятно, находилось в верхней

8.2. Анализ нарушения агрегации волокон $A\beta_{1-42}$

Из-за неполной полимеризации волокна распределение только (в отсутствии антитела) $A\beta_{1-42}$ -фибрилл было обнаружено в большем диапазоне фракций (11-15). Поэтому демонстрация способности к успешному и значительному нарушению антителами агрегации при совместной инкубации с ранее сформированными волокнами является более трудной по сравнению с анализом агрегации. Только сдвиг большей части волокон в сторону фракций меньшей плотности, но еще находящихся в диапазоне фракций, соответствующих только амилоидам, может свидетельствовать о способности нарушать агрегацию; основная полоса, соответствующая только амилоидам, представляет собой фракцию 12. Добавление mACI-01-Ab7 C2 в молярном соотношении 1:100 не приводило к сдвигу амилоидных волокон в сторону фракций с более низкой плотностью (все еще фракции 11-15), но вызывало сдвиг более сильного сигнала с фракции 12 в 11-ю фракцию при сравнении с только амилоидами. Несмотря на несоответствующие оптимальным условия, связанные с неполным формированием волокна, при использовании mACI-01-Ab7 C2 установлен невысокий, но выявляемый уровень активности в отношении нарушения агрегации. В противоположность этому, совместная инкубация ранее сформированных $A\beta_{1-42}$ -волокон с mACI-02-Ab6 продемонстрировала отсутствие сдвига полос в сторону фракции с более низкой плотностью при инкубации с использованием такого же молярного соотношения пептид:антитело, что и при применении mACI-01-Ab7 C2. Только при использовании в три раза более высокого соотношения 1:30 был обнаружен сдвиг амилоидных волокон из фракций 12-15 (только амилоид без совместной инкубации с антителом) во фракции 11-15. Таким образом, по-видимому, mACI-01-Ab7 C2 обладает несколько более выраженной способностью нарушать агрегацию, чем mACI-02-Ab6.

Выявление полос, соответствующих МАт, во фракциях в нижней половине градиента демонстрирует связывание mACI-02-Ab6 и mACI-01-Ab7 C2 с $A\beta_{1-42}$ -фибриллами (для обеих МАт фракций 11-15).

Способность mACI-01-Ab7 C2 нарушать агрегацию можно подтвердить с помощью дополнительного эксперимента, в котором можно продемонстрировать полную полимеризацию волокна по распределению $A\beta_{1-42}$ -фибрилл в отсутствие антитела во фракциях с 13 до Р (дебрис). В данных исследованиях сдвиг волокон во фракции с более низкой плотностью свидетельствует о способности антитела нарушать агрегацию при совместной инкубации с ранее сформированными волокнами. Добавление mACI-01-Ab7 C2 в молярном соотношении 1:100 приводило к сдвигу большей части амилоидных волокон с 13-й фракции в 12-ю фракцию и, кроме того, к сдвигу полосы с самой низкой плотностью с 13-й фракции в сторону 11-й фракции. Таким образом, mACI-01-Ab7 C2 также характеризуется выраженной активностью в отношении нарушения агрегации.

Выявление полос, соответствующих МАт, во фракциях в нижней половине градиента демонстрирует связывание mACI-01-Ab7 C2 с $A\beta_{1-42}$ -фибриллами (фракции с 11 до Р), в то время как полосы, соответствующие МАт во фракциях 4-7, соответствуют несвязанному антителу.

Для обобщения этих результатов следовало бы убедительно продемонстрировать,

что моноклональное антитело mACI-01-Ab7 C2, мишенью которого является пептид амилоида A β , связывается с ранее сформированными волокнами и обладает способностью ингибировать *in vitro* агрегацию мономерных A β -пептидов, приводящую к образованию волокон, и нарушать агрегацию ранее сформированных волокон.

Аналогичные результаты получены при использовании mACI-24-Ab4. Аналогично данным, полученным при анализе агрегации, полную полимеризацию можно обнаруживать по распределению только A β ₁₋₄₂-фибрилл во фракциях с 12 до Р (дебрис). В данных исследованиях сдвиг волокон во фракции с более низкой плотностью может свидетельствовать о способности антитела нарушать агрегацию при совместной инкубации с ранее сформированными волокнами. Добавление mACI-24-Ab4 в молярном соотношении 1:100 приводило к сдвигу максимума амилоидных волокон с 12-й фракции в 11-ю фракцию. Таким образом, mACI-24-Ab4 также характеризуется выраженной активностью в отношении нарушения агрегации.

Пример 9: Флуоресцентный анализ, применяемый для оценки ингибирования агрегации филаментов A β ₁₋₄₂ и нарушения агрегации ранее сформированных филаментов A β ₁₋₄₂ при совместной инкубации с МАТ

Флуоресцентный BIS-ANS-анализ

Для оценки ингибирующей активности МАТ использовали флуоресцентный анализ BIS-ANS (LeVine, 2002), который позволяет осуществлять специфическое выявление популяции мономерных или нефибриллярных филаментов A β ₁₋₄₂. Перед флуоресцентным анализом мономеры A β ₁₋₄₂ предварительно инкубировали либо с буфером в качестве контроля, либо с МАТ (молярное соотношение МАТ к A β ₁₋₄₂-пептиду 1:100) в течение 14 ч при 37°C. Относительные единицы флуоресценции определяли автоматически и результаты выражали в виде изменений относительно контроля в процентах.

Установлено, что mACI-02-Ab6 обладало слабой ингибирующей способностью по сравнению с контролем (125,8 $\pm$ 28,5% относительно 100 $\pm$ 29,5%). mACI-01-Ab7 C2, вероятно, обладало слабой активностью (108,0 $\pm$ 30,0%) и не имело преимущества по сравнению с контролем, которое обнаружено при использовании МАТ mACI-11-Ab9 и mACI-12-Ab11 (93,5 $\pm$ 21,9% и 73,2 $\pm$ 47,7%). Этот результат подтвердил данные, полученные с помощью ультрацентрифугирования, свидетельствующие о том, что mACI-01-Ab7 C2 обладает более высокой ингибирующей активностью, чем mACI-11-Ab9 и mACI-12-Ab11.

Пример 10: Флуоресцентный анализ с использованием тιοфлавина Т (Th-T)

Для оценки способности МАТ как ингибировать агрегацию, так и нарушать агрегацию, использовали флуоресцентный анализ с использованием тιοфлавина Т (Th-T), который специфически связывается с молекулами фибриллярного A β ₁₋₄₂ и интенсивность последующей флуоресцентной эмиссии которого коррелирует с количеством филаментов A β ₁₋₄₂, присутствующих в растворе.

Перед флуоресцентным анализом мономеры A β ₁₋₄₂ предварительно инкубировали либо с буфером (контроль), либо с МАТ (молярное соотношение МАТ и пептида A β ₁₋₄₂ 1:100) в течение 48 ч при 37°C. Относительные флуоресцентные единицы подсчитывали автоматически и результаты выражали в виде изменений относительно контроля в процентах. Установлено, что mACI-01-Ab7 C2 обладало выраженной способностью к ингибированию по сравнению с контролем (ср. 11,03 $\pm$ 20,7% и 100 $\pm$ 40,5%). Этот результат подтвердил данные, полученные с помощью ультрацентрифугирования, которые также свидетельствуют об ингибирующей активности mACI-01-Ab7 C2.

Для оценки способности МАт нарушать агрегацию применяли флуоресцентный анализ с использованием тιοфлавина Т (Th-T), который специфически связывается с молекулами фибриллярного $A\beta_{1-42}$ и интенсивность последующей флуоресцентной эмиссии которого коррелирует с количеством филаментов $A\beta_{1-42}$, присутствующих в растворе. Перед проведением анализа предварительно в течение 7 дней (при 37°C в 3ФР, рН 7,1) формировали волокно $A\beta$ и затем совместно инкубировали с МАт или буфером (отрицательный контроль) в течение 24 ч при 37°C в молярном соотношении 1:100 (МАт: $A\beta_{1-42}$). Относительные флуоресцентные единицы подсчитывали автоматически с помощью ридера для микропланшетов для ELISA и результаты выражали в виде изменений относительно контроля в процентах.

В двух независимых экспериментах по оценке способности нарушать агрегацию с использованием Th-T также было установлено, что mACI-01-Ab7 C2 обладало очень высокой способностью нарушать агрегацию по сравнению с контролем $35 \pm 11\%$ и $64,57 \pm 13,58\%$ (по сравнению с $100,0 \pm 15,37\%$) соответственно, что согласуется с данными, полученными с помощью ультрацентрифугирования.

С помощью Th-T-анализа установлено, что mACI-24-Ab4 также обладает выраженной способностью нарушать агрегацию ($62,99 \pm 10,34\%$ по сравнению с $100,0 \pm 10,03\%$; $p < 0,0001$).

mACI-11-Ab9 обладало несколько меньшей активностью ($28 \pm 14\%$), в то время как ACI-02-Ab6 и ACI-12-Ab11 не обладали заметной способностью нарушать агрегацию ($17 \pm 12\%$ и $13 \pm 11\%$ соответственно).

Обобщая данные, полученные с помощью ультрацентрифугирования и флуоресцентных анализов, можно сделать заключение о том, что mACI-01-Ab7 C2, mACI-01-Ab6 и mACI-24-Ab4 обладают бифункциональностью, ингибируя агрегацию волокна и укорачивая ранее сформированные $A\beta_{1-42}$ -филаменты в эксперименте с применением центрифугирования, что было подтверждено с помощью флуоресцентного анализа. Кроме того, в эксперименте с применением центрифугирования продемонстрировано специфическое связывание МАт с амилоидными волокнами.

С помощью ультрацентрифугирования установлено, что mACI-11-Ab9 обладало существенно более низкой способностью к ингибированию по сравнению с mACI-01-Ab7 C2 даже при использовании в 3 раза более высокой концентрации, что подтверждено с помощью BIS-ANS-анализа. При изучении с помощью центрифугирования и Th-T-анализа способности нарушать агрегацию установлено, что mACI-01-Ab7 C2 обладало способностью укорачивать ранее сформированные $A\beta_{1-42}$ -филаменты. При использовании в 3 раза более высокой концентрации в эксперименте с применением центрифугирования mACI-02-Ab6 также обеспечивало положительный результат в обоих анализах, но он был существенно более выраженным в эксперименте с применением центрифугирования.

Из вышеприведенных результатов очевидно, что mACI-01-Ab7 C2 и mACI-02-Ab6 представляют собой единственные антитела, которые при взаимодействии с $A\beta_{1-42}$ -филаментами обладают активностью, которую можно назвать бифункциональной, т.е. вызывающей ингибирование агрегации и нарушение агрегации ранее сформированных волокон.

Пример 11: Характеризация с помощью ЯМР- и флуоресцентного анализа взаимодействия моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 с меченным с помощью ^{13}C пептидом β -амилоида 1-42

Для оценки возможного механизма, с помощью которого МАт солибилизирует ранее сформированные волокна или ингибирует формирование волокон, осуществляли параллельный эксперимент по типу «голова-к-голове» с использованием флуоресцентного Th-T-анализа и ЯМР-спектроскопии твердого тела меченного с

помощью U- ^{13}C Tyr10- и Val12 пептида β -амилоида 1-42 (фиг.4). Таким образом, целью этого исследования было выявление перехода β -складчатой конформации в пептиде β -амилоида с помощью ЯМР-спектроскопии твердого тела и в присутствии моноклонального антитела и непосредственное сравнение полученных результатов с данными о способности нарушать агрегацию, которые были получены с помощью флуоресцентного Th-T-анализа.

ЯМР-спектроскопия твердого тела не только позволяет выявлять переход вторичной структуры, но также дает возможность выявить локализацию доменов $\text{A}\beta_{1-42}$ -пептида, в которых преобладает структурный переход. Установлено, что ЯМР-спектроскопию твердого тела можно применять для решения проблемы, связанной с определением структуры $\text{A}\beta_{1-42}$ -волокна (Petkova и др., 2004, Petkova и др., 2002). В частности, наличие корреляции между химическим сдвигом $^{13}\text{C}_\alpha$ и $^{13}\text{C}_\beta$ и вторичной структурой (Cornilescu и др., 1999, Luca и др., 2001, Iwadate и др., 1999) является важным инструментом для оценки изменений вторичной структуры внутри пептида.

Синтез пептида, меченного путем включения предварительно меченного с помощью ^{13}C валина в положение 12 (^{12}Val) и предварительно меченного с помощью ^{13}C тирозина в положение 10 (^{10}Tyr), осуществляли с помощью протокола синтеза, предусматривающего применение Fmoc. Идентичность и чистоту пептида подтверждали с помощью MALDI-масс-спектроскопии. Меченый β -амилоидный пептид (1-42) применяли для получения волокон путем инкубации раствора пептида в ЗФР-буфере в течение 1 недели при 37°C. Основную проблему, связанную с плохой растворимостью β -амилоидного пептида в ЗФР-буфере, можно решать следующим образом: для растворения β -амилоидного пептида значение pH ЗФР-буфера временно повышали с помощью очень небольшого количества аммиака. Исходное значение pH ЗФР-буфера возвращали путем инкубации образца в присутствии более крупной партии ЗФР, основываясь на характеристиках летучести аммиака.

Для оценки воздействия нарушающих β -складчатую конформацию антител раствор волокон инкубировали с антителом в течение 24 ч при 37°C при проведении как ЯМР-, так и Th-T-анализа. Для сравнения в реальном времени аликвоту одного и того же раствора применяли для флуоресцентного Th-T-анализа и оставшийся раствор лиофилизовали для ЯМР-исследования.

После того как сначала с помощью флуоресцентного Th-T-анализа было проведено изучение способности mACI-01-A β 7 C2 нарушать агрегацию при совместной инкубации с ранее сформированными мечеными с помощью ^{13}C амилоидными β -волокнами, было установлено, что МАт нарушает агрегацию волокон на 38%. После этого осуществляли анализ ЯМР-спектров.

Для оценки различий между инкубацией с ЗФР (контроль) и МАт каждый спектр подвергали деконволюции с помощью программы ФЭАkFit (<http://www.systat.com/products/ФЭАkFit>). Линии подгоняли с требуемой точностью, применяя процедуру аппроксимации смешанного Лоренц/Гауссовского типа, полученные результаты представлены на фиг.4. Эти результаты обобщены в таблице 3, при этом наиболее выраженное различие заключалось в интегральных интенсивностях для двух популяций,

которые необходимы для аппроксимации двойного пика в диапазоне 30-33 част./млн. Пик при 33 част./млн соответствовал бета-складчатой конформации волокон, а пик при 30 част./млн соответствовал конформации в виде произвольной спирали. Для образца, который инкубировали в ЗФР, обнаружено наиболее высокое содержание метки в бета-складчатой конформации (81,7%) (фиг.4. верхняя часть), которое снижалось при инкубации образца с mACI-01-Ab7 C2 (53,5%) (фиг.4, нижняя часть). Снижение популяции бета-складчатой конформации в сторону конформации в виде произвольной спирали, установленное в опыте с использованием Val-¹²Cβ, составляло порядка 35% и, таким образом, хорошо совпадало с результатами, полученными с помощью флуоресценции.

Таблица 3

Сравнение аппроксимированных параметров для двух конформаций Val-¹²Cβ. Аппроксимированные химические сдвиги для двух конформаций полностью аналогичны, но интегральные интенсивности очень сильно различаются, отражая снижение уровня исходной бета-складчатой конформации примерно на 35% (1-(53,5/81,7)). Это очень хорошо согласуется со значением, полученным с помощью флуоресцентного анализа

Резонанс	ЗФР			MACI-01-Ab7 C2		
	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% интегральной интенсивности	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% интегральной интенсивности
Val-Cβ-бета-складчатая конформация	32,60	479	81,7	30,09	366	53,5
Val-Cβ-конформация в виде произвольной спирали	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

Обобщая эти результаты, можно убедительно продемонстрировать, что моноклональное антитело mACI-01-Ab7 C2, мишенью которого является N-концевая 1-16-область амилоидного Aβ-пептида, связывается с ранее сформированными волокнами и обладает способностью ингибировать *in vitro* агрегацию мономерных Aβ-пептидов, приводящую к образованию волокон, и нарушать агрегацию ранее сформированных волокон, что было продемонстрировано в эксперименте по ультрацентрифугированию в градиенте плотности, а также с помощью флуоресцентного Th-T-анализа. Кроме того, путем связывания этого антитела с ранее сформированными волокнами можно индуцировать переход большей части бета-складчатой конформации во вторичную конформацию в виде произвольной спирали в окрестности Val12. Это может представлять собой возможный механизм, посредством которого волокна можно сольюбилизовать путем связывания моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2, поскольку также детальный анализ пика Val-¹²Cβ позволил выявить снижение компонента с бета-складчатой конформацией на 35%, что хорошо согласуется с данными флуоресцентного анализа (38%).

Пример 12: Функциональная активность mACI-01-Ab7 C2 в отношении амилоидных волокон

12.1 Модификация конформации Aβ₁₋₄₂-волокон и инициация нарушения агрегации после связывания антитела mACI-01-Ab7 C2

Для оценки механизма, с помощью которого антитело нарушает агрегацию сформированных Aβ₁₋₄₂-волокон, осуществляли сравнение по типу «голова-к-голове» результатов, полученных с использованием флуоресцентного тиафлавин-Т-(Th-T)-анализа, который проводили для оценки нарушения агрегации, и анализа с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия твердого тела) меченного с

помощью U-¹³C тирозина 10 и меченного с помощью валина 12 пептида Aβ₁₋₄₂, который применяли для определения вторичной конформации. Антитело солубилизировало 35,4% ранее сформированных Aβ₁₋₄₂-волокон и в то же время индуцировало сдвиг

5 вторичной конформации от бета-складчатой конформации в сторону конформации в виде произвольных спиралей. Снижение популяции бета-складчатой конформации в сторону конформации в виде произвольной спирали составляло порядка 35% и, таким образом, хорошо совпадало с результатами, полученными с помощью флуоресцентного Th-T-анализа. Эти данные свидетельствуют о том, что связывание антитела

10 инициировало переход вторичной структуры, что, возможно, вызывало дестабилизацию параллельного межмолекулярного устройства бета-складок, оказывая воздействие на расщепление удлиненных волокон на более мелкие фрагменты.

12.2 Зависящая от конформации аффинность к связыванию антитела mACI-01-Ab7 C2

15 Поскольку из научной литературы хорошо известно, что часть энергии связывания антитело-антиген можно использовать для зависящей от энергии модификации конформации антигена⁶, осуществляли сравнительный эксперимент по оценке аффинности связывания антитела mACI-01-Ab7 C2 с полным белком Aβ₁₋₄₂ и с более коротким, состоящим из 9 аминокислот пептидом, который содержал эпитоп для

20 антитела. Для этого сравнения аффинности антитела mACI-01-Ab7 C2 применяли ELISA с использованием биотинилированных пептидов, перекрывающих полную аминокислотную последовательность эпитопа mACI-01-Ab7 C2 (аминокислоты 13-21 последовательности Aβ₁₋₄₂, созданные на фирме Mimotopes и поступающие в продажу от фирмы ANAWA Trading SA), и биотинилированного полного пептида Aβ₁₋₄₂ (фирма

25 Bachem). Анализ осуществляли согласно инструкциям производителя (фирма Mimotopes). Аффинность к связыванию антитела с пептидом, содержащим специфический эпитоп (аминокислоты 13-21 последовательности Aβ₁₋₄₂), оказалось на 38,40% выше по сравнению с аффинностью к связыванию с полным белком Aβ₁₋₄₂. Таким образом,

30 можно предположить, что различие в энергии аффинности связывания использовалось для связанного с поглощением энергии перехода вторичной структуры амилоидного белка для презентации антигена в более доступном положении для связи с антителом. Это может объяснить, почему аффинность антитела является более низкой для нативной (полный амилоидный белок), чем для выделенной субъединицы.

35 Пример 13: Специфическое для конформации связывание mACI-01-Ab7 C2 с различными классами амилоидного белка

Для оценки специфичности mACI-01-Ab7 C2 к амилоидному белку на разных стадиях его полимеризации осуществляли анализ мономерных и полимерных растворимых амилоидов, прежде всего белка амилоида β (Aβ) и фибриллярного амилоида, с

40 использованием планшетов для ELISA, сенсibilизированных указанными различными стадиями полимерного бета-амилоида. Мономеры получали согласно модифицированному опубликованному методу⁷, полимерный растворимый амилоид, прежде всего амилоид β (Aβ) согласно методу⁸, а волокна получали инкубацией

45 амилоида (фирма Bachem, Швейцария) с конечной концентрацией 1 мкг/мкл Трис/HCl, pH 7,4 при 37°C в течение 5 дней с последующей стадией центрифугирования (10000 об/мин в течение 5 мин). После этого амилоидными полимерами сенсibilизировали планшеты для ELISA с использованием конечной концентрации 55 мкг/мл и аффинность

к связыванию определяли с помощью ELISA с использованием антимышиного моноклонального антитела в виде IgG (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), меченного щелочной фосфатазой. Антитело связывалось с более высокой аффинностью с полимерным растворимым белком амилоида β ($A\beta$) ($IC_{50}=2,53$ нМ), чем с волокнами ($IC_{50}=5,27$ нМ), и с наименьшей аффинностью с мономерами ($IC_{50}=8,3$ нМ). Эти результаты демонстрируют, что на связывание антитела влияет помимо эпитопа конформация различных амилоидных агрегатов.

Пример 14: Картирование эпитопов моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2

Картирование эпитопов моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 осуществляли с помощью ELISA, используя три различные пептидные библиотеки. Одна библиотека содержала в целом 33 биотинилированных пептида, перекрывающих полную аминокислотную (ак) последовательность $A\beta_{1-42}$ (созданную на фирме Mimotopes и поступающую в продажу от фирмы ANAWA Trading SA), вторая библиотека содержала биотинилированные пептиды, в ней использовали пептид 12 (ак 12-20 $A\beta$) из первой пептидной библиотеки и заменяли каждую аминокислоту в последовательности аланином (см. таблицу 4 ниже), а третья библиотека содержала биотинилированные пептиды 13, 14 или 15 (ак 13-21, 14-22 или 15-23 $A\beta$) и в ней заменяли в каждом случае последние аминокислоты на аланин или на глицин, как в случае ак 21, которая уже представляла собой аланин (см. таблицу 5 ниже). В качестве положительного контроля использовали биотинилированный полный пептид $A\beta_{1-42}$ (фирма Bachem). Картирование эпитопов осуществляли согласно инструкциям производителя (фирма Mimotopes). В целом, метод состоял в следующем: сенсibilизированные стрептавидином планшеты (фирма NUNC) блокировали 0,1% БСА в ЗФР в течение ночи при 4°C. После промывки ЗФР-0,05% Твин 20 планшеты сенсibilизировали в течение 1 ч при КТ различными пептидами из библиотеки, разведенными в 0,1% БСА, 0,1% азида натрия в ЗФР до конечной концентрации 10 мкМ. После отмывки планшеты инкубировали в течение 1 ч при КТ с антителом mACI-01-Ab7 C2 или с применяемым в качестве контроля изотипа мышинным антителом в виде IgG2b, разведенным до концентрации 10 мкг/мл в 2% БСА, 0,1% азида натрия в ЗФР. Планшеты вновь промывали и инкубировали с конъюгированным со щелочной фосфатазой козым антимышиным IgG в течение 1 ч при КТ. После окончательной промывки планшеты инкубировали с субстратом фосфатазы (pNPP) и считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA.

Установлено, что моноклональное антитело mACI-01-Ab7 C2 связывалось специфически с пептидами 12, 13, 14 и 15 из первой пептидной библиотеки. Эти 4 пептида содержали ак 12-20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) и 15-23 (QKLVFFAED) $A\beta_{1-42}$, это позволяло предположить, что эпитоп находится в 12-23-области $A\beta$. Вторую библиотеку, созданную путем замены на аланин, использовали для определения ак, имеющих решающее значение для связывания с пептидом 12-20 (VHHQKLVFF). Связывание антитела mACI-01-Ab7 C2 практически полностью элиминировалось при замене ак 16, 17, 19 или 20 на аланин, эти результаты свидетельствуют о том, что эти ак имеют в высшей степени решающее значение для связывания антитела с $A\beta$. Связывание антитела mACI-01-Ab7 C2 частично снижалось, когда заменяли ак 15 и 18.

Связывание также практически полностью элиминировалось, когда ак 14 заменяли аланином, что свидетельствует о том, что ак 14 также очень важна для связывания.

И, наконец, третью библиотеку применяли для выяснения вопроса о том, имеют ли решающее значение для связывания с эпитопом ак 21, 22 или 23. Связывание антитела

с ак 15-23 снижалось, когда ак 23 заменяли аланином, что свидетельствует о важности ак 23 для связывания. Связывание частично снижалось при замене ак 21 на глицин и слегка снижалось при замене ак 22 на аланин.

Таблица 4

Перечень пептидов, применяемых во второй библиотеке. Ак, важные для связывания, обозначены курсивом и подчеркнуты, а ак, имеющие в высшей степени решающее значение для связывания, обозначены курсивом, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	k	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
ак no.	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Таблица 5

Перечень пептидов, применяемых в третьей библиотеке. Ак, важные для связывания, обозначены курсивом и подчеркнуты, а ак, имеющие в высшей степени решающее значение для связывания, обозначены курсивом и выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

20	p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
	p13-21	G21	H	H	Q	K		V	F	F	G		
	p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
	p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
	p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
	p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
25	ак no.		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Пример 15: Влияние пассивной иммунизации с использованием mACI-01-Ab7 C2 на амилоидную загрузку головного мозга несущих один трансген hAPP мышей

Для оценки *in vivo* способности моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2

связываться и очищать головной мозг от растворимого амилоида для опытов по пассивной иммунизации разными дозами использовали 6-месячных мышей, несущих

один hAPP⁹, подобранных по полу и возрасту. Загрузку растворимым амилоидом анализировали в конце опыта, изымая головной мозг животных и осуществляя специфический для A β ₁₋₄₀ и A β ₁₋₄₂ ELISA (фирма TGC, Германия). 8-13 животным в

группе вводили с недельным интервалом две инъекции по 100, 300 и 1000 мкг моноклонального антитела в 200 мкл ЗФР, контрольным животным вводили путем инъекции только ЗФР. Через 1 день после второй инъекции животных умерщвляли для осуществления биохимического анализа фракции растворимого амилоида. Для количественной оценки человеческого A β ₁₋₄₀ и человеческого A β ₁₋₄₂ в растворимой

фракции гомогенатов головного мозга и/или спинномозговой жидкости (CSF) использовали поступающие в продажу наборы для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (h Amyloid β 40 или β 42 ELISA, высокочувствительный, фирма TGC, Швейцария). ELISA осуществляли согласно протоколу производителя. В целом, метод состоял в следующем: стандарты (разбавление синтетического A β ₁₋₄₀ или A β ₁₋₄₂) и

образцы приготавливали в 96-луночном полипропиленовом планшете, который не обладал способностью связываться с белком (фирма Greiner, Германия). Разведения стандартов с конечными концентрациями 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 и 15,6 пг/мл и образцов приготавливали с помощью разбавителя для образцов, который входил с

состав набора для ELISA, до конечного объема 60 мкл. Поскольку уровни амилоидов повышаются по мере увеличения возраста мышей и поскольку для надежной оценки необходимо осуществлять анализ образцов в пределах линейной области стандартной кривой, образцы для анализа $A\beta_{1-40}$ разводили в соотношении 2:3, а образцы $A\beta_{1-42}$ анализировали без разведения.

Образцы, стандарты и контрольные пробы (по 50 мкл) добавляли в сенсibilизированный антителом к $A\beta$ полистирольный планшет (иммобилизованное антитело, которое избирательно распознает C-конец антигена), а также конъюгатом селективного антитела к $A\beta$ (биотинилированное идентифицирующее антитело) и инкубировали в течение ночи при 4°C для того, чтобы произошло формирование комплекса антитело-амилоид-антитело. На следующий день добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза, а через 30 мин добавляли смесь ТМВ/пероксид, что приводило к превращению субстрата в окрашенный продукт, и интенсивность окраски оценивали фотометрически с помощью ридера для ELISA с использованием фильтра, установленного на длину волны 450 нм. Данные о содержании $A\beta$ в образцах получали путем сравнения абсорбции со стандартной кривой, построенной с использованием синтетического $A\beta_{1-40}$ или $A\beta_{1-42}$. Данные выражали в виде индивидуальных изменений относительно усредненного контрольного значения (в процентах к контролю).

При пассивной иммунизации несущих один трансген hAPP мышей посредством двух i.p-инъекций моноклональным антителом ACI-01-Ab7 C2 в дозе 300 мкг ($A\beta_{1-40}$: $-27,3 \pm 13,9\%$, $p < 0,05$; $A\beta_{1-42}$: $-8,6 \pm 22,4$, $p = 0,56$; неспаренный t-критерий Стьюдента) общее количество $A\beta_{1-40}$ в гомогенатах головного мозга снижалось достоверно, а количество $A\beta_{1-42}$ в целом снижалось, но не достоверно, в то время как при использовании доз 100 и 1000 мкг достоверных различий не обнаружено. Иммунизации дозой 100 мкг приводила в повышению уровня $A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$ в гомогенатах головного мозга ($A\beta_{1-40}$: $32,3 \pm 36,8\%$; $A\beta_{1-42}$: $38,3 \pm 51,4\%$), а обработка дозой 1000 мкг приводила к выраженной тенденции снижения амилоидной загрузки и могла обладать потенциальной достоверной эффективностью при увеличении количества животных в группе ($A\beta_{1-40}$: $-2,2 \pm 26,0\%$; $A\beta_{1-42}$: $-9,3 \pm 15,9\%$). Эти данные свидетельствуют о том, что протокол острой иммунизации антителом mACI-01-Ab7 C2 может приводить к снижению общего количества $A\beta$ в головном мозге на этой мышинной модели болезни Альцгеймера (AD). Важно отметить, что зависимость от дозы является кратковременной, поэтому для получения статистических достоверных результатов требуется проводить большее количество экспериментов с использованием более крупных групп.

Пример 16: Влияние постоянного пассивного введения mACI-01-Ab7 C2 на загрузку бляшками в опытах на несущих двойной трансген мышах линии hAPP $\times$ PSI

Для оценки способности *in vivo* моноклонального антитела mACI-01-Ab7 C2 связываться и снижать уровень амилоидных бляшек в головном мозге использовали 3,5-месячных, несущих двойной трансген hAPP $\times$ PSI мышей¹⁰, подобранных по полу и возрасту, в опыте по 4-месячной постоянной пассивной иммунизации. Амилоидные бляшки анализировали в конце опыта путем гистохимического анализа головного мозга животных по связыванию тиофлавина S.

15 трансгенным животным вводили еженедельно в течение 16 недель по 500 мкг моноклонального антитела в ЗФР. 15 животным инъектировали только ЗФР, и они служили контролем. Все инъекции осуществляли внутривентрикулярно. При умерщвлении мышей анестезировали и пропускали через сердце струю физиологической сыворотки

при 4°C для удаления крови из сосудов головного мозга. Затем головной мозг изымали из черепа и разделяли задний мозг и передний мозг путем коронального/фронтального разреза. Передний мозг разделяли поровну на левую и правую полушару с помощью сагиттального разреза по средней линии. Одну полушару затем фиксировали в течение 5 ночи в 4%-ном параформальдегиде для гистологического анализа. Получали сагиттальные вибраторные срезы (40 мкм) для инкубации в свободном потоке и хранили при 4°C до окрашивания в ЗФР 0,1%-ным азидом натрия. По пять срезов, полученных на различных уровнях, окрашивали для выявления плотных бляшек с помощью тиофлавина S. Срезы всех животных произвольно отбирали для окрашивания и 10 количественной оценки вслепую. Изображения получали с помощью микроскопа Leica DMR, снабженного камерой Sony DXC-9100P, и анализировали с помощью компьютера с использованием программы Leica Q-Win. Интенсивность света и установочные параметры конденсора для микроскопа поддерживали на постоянном уровне в процессе получения изображений. Все полученные изображения обрабатывали с помощью одних 15 и тех же компьютерных подпрограмм для минимизации ошибок, связанных с человеческим фактором (исследователем). Пороговая плотность срезов была постоянной в процессе анализа. Для автоматической количественной оценки амилоидной загрузки при окрашивании тиофлавином S была выбрана область подставки (переходная область между парагиппокампальной извилиной и аммоновым рогом).

Общую загрузку бляшками и количество бляшек в области основания можно 20 достоверно снижать путем описанной выше пассивной иммунизации несущих двойной трансген hAPP/PS1 мышей в течение 4 месяцев. При этом было достигнуто достоверное снижение загрузки бляшками на 31% (mACI-01-Ab7 C2: $1,11 \pm 0,21\%$ и контроль: $1,61 \pm 0,35\%$; $p=0,003$, U-критерий Манна-Уитни), в то же время постоянная пассивная 25 иммунизация достоверно снижала количество бляшек на 19% (mACI-01-Ab7 C2: $8,73 \pm 1,36$ и контроль: $10,78 \pm 1,36$; $p=0,006$, U-критерий Манна-Уитни), эти данные свидетельствуют о том, что солубилизация бляшек происходит в несколько меньшей степени, чем разрушение бляшек.

Пример 17: Влияние пассивной вакцинации с помощью mACI-01-Ab7 C2 на 30 способность к запоминанию у несущих один трансген hAPP мышей

Для анализа *in vivo* способности антитела mACI-01-Ab7 C2 модифицировать или увеличивать когнитивную функцию для опытов по пассивной иммунизации использовали 9-месячных мышей, несущих один трансген hAPP, подобранных по полу и возрасту. Непространственную способность к запоминанию оценивали в конце периода 35 иммунизации с помощью нового теста Object Recognition Task (ORT) (задача на опознавание объекта).

Группам по 12 животных вводили внутрибрюшинно две инъекции по 400 мкг моноклонального антитела в 200 мкл ЗФР, контрольным животным вводили только ЗФР. Через 1 день после второй инъекции способность к запоминанию изучали с 40 помощью новой задачи на опознавание объекта)^{12,13}. Отобранных для опыта мышей помещали на 10 мин на арену для поведенческих опытов и ставили перед ними новый незнакомый объект (предмет). Регистрировали время исследования. Через 3 ч этих же животных вновь помещали на эту же арену для 2-ого сеанса, но перед ними ставили 45 старый, ранее исследованный, объект, а также новый объект. Вновь регистрировали время исследования обоих объектов и рассчитывали полученный в результате коэффициент опознавания, который определяли как отношение времени, затраченного на исследование нового объекта, по сравнению с общим временем, затраченным на исследование, и выражали в виде изменений относительно контроля.

Пассивная вакцинация mACI-01-Ab7 C2 приводила к существенному повышению когнитивной способности к запоминанию у несущих один трансген мышей-моделей AD (mACI-01-Ab7 C2: $131,6 \pm 9,1\%$ и контроль: $100,0 \pm 9,2\%$, $p < 0,05$; непарный t-критерий Стьюдента и $n=12$ в каждой группе).

5 Депонирование

В соответствии с Будапештским договором в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур («Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)», Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig) депонированы следующие линии клеток гибридом:

Обозначение линии гибридомы	Обозначение антитела	Дата депонирования	Регистрационный номер
FP 12H3	mACI-01-Ab7	01 декабря 2005 г.	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACI-01-Ab7C2	01 декабря 2005 г.	DSM ACC2750
FP 12H2-G2	mACI-01-Ab7G2	01 декабря 2005 г.	DSMACC2751
ET 7E3	mACI-02-Ab6	08 декабря 2005 г.	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	08 декабря 2005 г.	DSM ACC2756

Ссылки

1. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T, Nature Med. 6, 2000, cc.916-919.
2. Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H, «Globular amyloid beta- peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease», J Neurochem, 95, 2005, cc.834-847.
3. Baschong W, Wrigley NG, «Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview», J Electron Microscop Tech 14, 1990, cc.313-323.
4. Blond и Goldberg, PNAS, т.84, №5, 1 марта 1987 г., cc.1147-1151.
5. Cornilescu G, Delaglio F, Bax A., J.Biomol.NMR, 13, 1999, cc.289-302.
6. Burdick. D. и др., «Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs», J. Biol. Chem. 267, 1992, cc.546-554.
7. DeMattos, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman D.M, Proc Natl Acad Sci USA 98, 2001, cc.8850-8855.
8. Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF, «Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin 1», J Neurosci 20, 2000, cc.6452-6458.
9. Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F, «Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice», J Neurosci 22, 2002, cc.3445-3453.
10. Glenner и Wong, Biochem Biophys Res Comm, 129, 1984, cc.885-890.
11. Harlow и Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 1988.
12. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF, «Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid

plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice», J Neuroinflammation 2, 2005, с.22.

13. Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421.

14. Iwadata M, Asakura T, Williamson MP, J.Biomol.NMR; 13, 1999, cc.199-211.

15. Kirschner DA, Abraham C и Selkoe.D.J., «X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross- beta conformation», Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 83, 1986, cc.503-507.

16. Khaw B.A. и др. J. Nucl. Med. 23, 1982, cc.1011-1019.

17. Kennedy J. H., и др., Clin. Chim. Acta 70, 1976, cc.1-31.

18. Klein WL, «Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets», Neurochem Int 41(5), 2002, cc.345-352.

19. Kohler и Milstein, Nature 256, 1975, cc.495-497.

20. LeVine, H. III, Arch Biochem Biophys 404, 2002, cc.106-115.

21. Luca и др., 2001.

22. McGeer и др., 1994.

23. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF, «Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain», J Biol Chem 274, 1999, cc.6483-6492.

24. Nelson R. и Eisenberg. D., «Recent atomic models of amyloid fibril structure», Curr. Opin. Struct. Biol., 2006.

25. Nicolau C, Greferath R., Balaban T. S., Lazarte J. E. и Hopkins, R. J., Proc Natl Acad Sci USA 99, 2002, cc.2332-2337.

26. Queen и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, cc.10029-10032.

27. Pearson W.R., Methods in Enzymology 183, 1990, cc.63-98

28. Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R., J.Mol.Biol., 335, 2004, cc.247-260.

29. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R., Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A; 99, 2002, cc.16742-16747.

30. Rousseaux и др. Methods Enzymology, 121, изд-во Academic Press, 1986, cc.663-69.

31. Rzepecki P, Nagel-Steger L., Feuerstein S., Linne U., Molt O., Zadnarski R., Aschermann K., Wehner M., Schrader. T. и Riesner D., J Biol Chem 279, 2004, cc.47497-47505.

32. Sambrook и др. loc. cit.

33. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K1 Huang J, Smith, S. O. и Bormann B. J., Proc Natl Acad Sci USA 92, 1995, cc.488-491.

34. Schenk и др., 1999.

35. Schurs A. H. W. M. и др., Clin. Chim Acta 81, 1977, cc.1-40.

36. Slot JW, Geuze HJ, «A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry», Eur J Cell Biol 38, 1985, cc.87-93.

37. Smith и Waterman, Advances in Applied Mathematics 2, 1981, cc.482-489.

38. Van dA, I, Wera S, Van LF, Henderson ST, «A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease», Nutr Metab (Lond) 2, 2005, с.28.

39. Wagner и др., Journal of Liposome Research, т.12(3), 2002, cc.259-270.

40. Ye J., Dave U. P., Grishin N. V., Goldstein J. L. и Brown M. S., Proc Natl Acad Sci USA 97, 2000, cc.5123-5128.

41. Zrein и др., Cinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 5(1), 1998, cc.45-49.

42. Experimental Eye Research 78, 2004, cc.243-256.

43. WO 2004/058258.

44. WO 96/1359.

45. WO 96/29605.

Формула изобретения

1. Гибридомная клеточная линия FP12H3-C2, депонированная под регистрационным номером DSM ACC2750, продуцирующая антитело против бета-амилоида.

2. Способ получения гуманизированного антитела против бета-амилоида, включающий определение гипервариабельной области (CDR) антитела против бета-амилоида, полученного гибридомной клеточной линией по п.1, и вставку CDR в каркас иммуноглобулина человека.

3. Способ диагностики ассоциированного с бета-амилоидом заболевания или нарушения у пациента, где ассоциированное с бета-амилоидом заболевание или нарушение выбрано из амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), и заболевания или нарушения, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча), комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых, старческий сердечный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, где указанный способ включает обнаружение иммуноспецифического связывания антитела против бета-амилоида или его активного фрагмента с эпитопом бета-амилоидного белка в образце, который включает стадии, в которых:

(а) приводят в контакт образец, который предположительно содержит бета-амилоидный антиген, с антителом против бета-амилоидного или его активным фрагментом, где антитело против бета-амилоида получено с помощью гибридомной клеточной линии по п.1 или способом по п.2, где антитело или его активный фрагмент связывается с эпитопом бета-амилоидного белка;

(b) позволяют антителу или его активному фрагменту связаться с бета-амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(c) определяют формирование иммунологического комплекса; и

(d) определяют корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса и присутствием или отсутствием бета-амилоидного антигена в образце.

4. Способ определения степени поражения ткани амилоидогенными бляшками, который включает:

(a) получение образца, характерного для исследуемой ткани;

(b) оценку наличия в образце бета-амилоидного антигена с помощью антитела против бета-амилоида или его активного фрагмента, где антитело против бета-амилоида получено с помощью гибридомной клеточной линии по п.1 или способом по п.2, где антитело или его активный фрагмент связывается с эпитопом бета-амилоидного белка;

(c) определение количества антитела или его активного фрагмента, связанного с бета-амилоидным антигеном; и

(d) расчет поражения бляшками ткани.

5. Способ по п.3, в котором определяют формирование иммунологического комплекса на стадии с), так что присутствие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с присутствием или отсутствием бета-амилоидного антигена.

6. Способ диагностики предрасположенности к ассоциированному с бета-амилоидом заболеванию или состоянию у пациента, где ассоциированное с бета-амилоидом заболевание или состояние выбрано из амилоидоза, группы заболеваний и нарушений, ассоциированных с образованием бета-амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и связанный с возрастом амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (AD), и заболевания или нарушения, характеризующиеся утратой когнитивной способности к запоминанию, такие, например, как умеренное ухудшение когнитивной способности (MCI), деменция, связанная с тельцами Леви, синдром Дауна, наследственное церебральное кровоизлияние, сопровождающееся амилоидозом (типа Дутча), комплекс деменции Гуама-Паркинсона, а также другие заболевания, которые обусловлены или ассоциированы с амилоидоподобными белками, такие как прогрессирующий надъядерный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, связанная с ВИЧ деменция, ALS (амиотрофический боковой склероз), миозит, вызываемый тельцами включения (IBM), диабет взрослых, старческий сердечный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие заболевания, включая дегенерацию желтого пятна, где указанный способ включает выявление иммуноспецифического связывания антитела против бета-амилоида или его активного фрагмента с эпитопом бета-амилоидного белка в образце, для чего:

(a) приводят в контакт образец с антителом против бета-амилоида или его активным фрагментом, где антитело против бета-амилоида получено из гибридомы по п.1 или способом по п.2, где антитело или его активный фрагмент связывается с эпитопом бета-амилоидного белка;

(b) позволяют антителу или его активному фрагменту связаться с бета-амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(c) обнаруживают формирование иммунологического комплекса;

(d) определяют корреляцию между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса с присутствием или отсутствием бета-амилоидного антигена в образце; и

(e) сравнивают количество иммунологического комплекса с количеством в нормальном контрольном образце,

при этом повышение количества указанного иммунологического комплекса по сравнению с количеством в нормальном контрольном образце свидетельствует о том, что пациент страдает или имеет риск развития ассоциированного с амилоидом заболевания или нарушения.

7. Способ мониторинга минимальных остаточных признаков заболевания у пациента после лечения антителом или его активным фрагментом, где способ включает:

(a) приведение в контакт образца пациента с антителом против бета-амилоида или его активным фрагментом, где антитело против бета-амилоида получено с помощью гибридомы по п.1 или способом по п.2, где антитело или его активный фрагмент связывается с эпитопом бета-амилоидного белка;

(b) связывание антитела или его активного фрагмента с бета-амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(c) обнаружение формирования иммунологического комплекса;

(d) определение корреляции между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса с присутствием или отсутствием бета-амилоидного антигена в образце; и

(е) сравнение количества указанного иммунологического комплекса с количеством в нормальном контрольном образце,

при этом повышение количества указанного иммунологического комплекса по сравнению с количеством в нормальном контрольном образце свидетельствует о том, что пациент все еще страдает минимальными остаточными признаками заболевания.

8. Способ прогнозирования чувствительности пациента, получающего лечение антителом или его активным фрагментом, включающий:

(а) приведение в контакт образца пациента с антителом против бета-амилоида или его активным фрагментом, где антитело против бета-амилоида получают с помощью гибридомы по п.1 или способом по п.2, где антитело или его активный фрагмент связывается с эпитопом бета-амилоидного белка;

(b) связывание антитела или его активного фрагмента с бета-амилоидным антигеном с образованием иммунологического комплекса;

(с) обнаружение формирования иммунологического комплекса;

(d) определение корреляции между присутствием или отсутствием иммунологического комплекса с присутствием или отсутствием бета-амилоидного антигена в образце; и

(е) сравнение количества иммунологического комплекса до и после начала лечения, при этом снижение количества указанного иммунологического комплекса свидетельствует о том, что пациент имеет высокую вероятность того, что он будет отвечать на лечение.

9. Способ получения антитела против бета-амилоида, включающий культивирование гибридомной клеточной линии по п.1.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> АЦ ИММУНЕ СА
- <120> Специфические в отношении амилоида бета (А бета) 1-42 моноклональные антитела, обладающие терапевтическими свойствами
- <130> L3017 PCT
- <150> EP 05027092.5
- <151> 2005-12-12
- <150> EP 06014729.5
- <151> 2006-07-14
- <150> EP 06020766.9
- <151> 2006-10-02
- <160> 22
- <170> PatentIn версия 3.3
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> антигенный пептид A β ₁₋₁₅
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | |
- <210> 2
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> антигенный пептид A β ₁₋₁₆
- <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
- <210> 3
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₁₋₁₆(Δ 14)

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₂₂₋₃₅

<400> 4

Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met
 1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₂₉₋₄₀

<400> 5

Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
 1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₁₋₁₇

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 9
<211> 336
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 9
gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 10
<211> 417
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 10
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat 60
gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcatga ctagtcagag ccttgatat agtaatggag acacctattt acattgggtac 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
gggggtcccag acagggttcag tggcagtggga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 11
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 11
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 12
 <211> 408
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 12
 atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может представлять собой Asn или Gln
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 13

His Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может представлять собой His, Asn, Gln, Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>

<221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа может представлять собой His, Asn, Gln, Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 14

Хаа His Хаа Хаа Хаа Хаа Phe Phe Хаа Хаа Хаа
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может представлять собой His, Asn, Gln, Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 15

Хаа Хаа Lys Leu Хаа Phe Phe Хаа Хаа Хаа
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<220>

<221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 16

His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может представлять собой His, Asn, Gln, Lys или Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 17

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Хаа может представлять собой Glu или Asp

<400> 18

His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
1              5              10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Хаа может представлять собой His, Asn, Gln, Lys или Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Хаа может представлять собой Asn или Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Хаа может представлять собой Lys, His, Asn, Gln или Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Хаа может представлять собой Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Pheили Ile

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa может представлять собой Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa может представлять собой Glu или Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa может представлять собой Glu или Asp

<400> 19

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 20

Val His His Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

<210> 21
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 21

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 22
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 115 120 125

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 145 150 155 160

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
 165 170 175

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 180 185 190

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
 195 200 205

Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
 290 295 300

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
 370 375 380

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
 405 410 415

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
 420 425 430

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

A β 1-15 (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-
 Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys-Lys-OH

A β 1-16 (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
 Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 1-16(Δ 14) (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-
 Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 22-35 (ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-
 Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

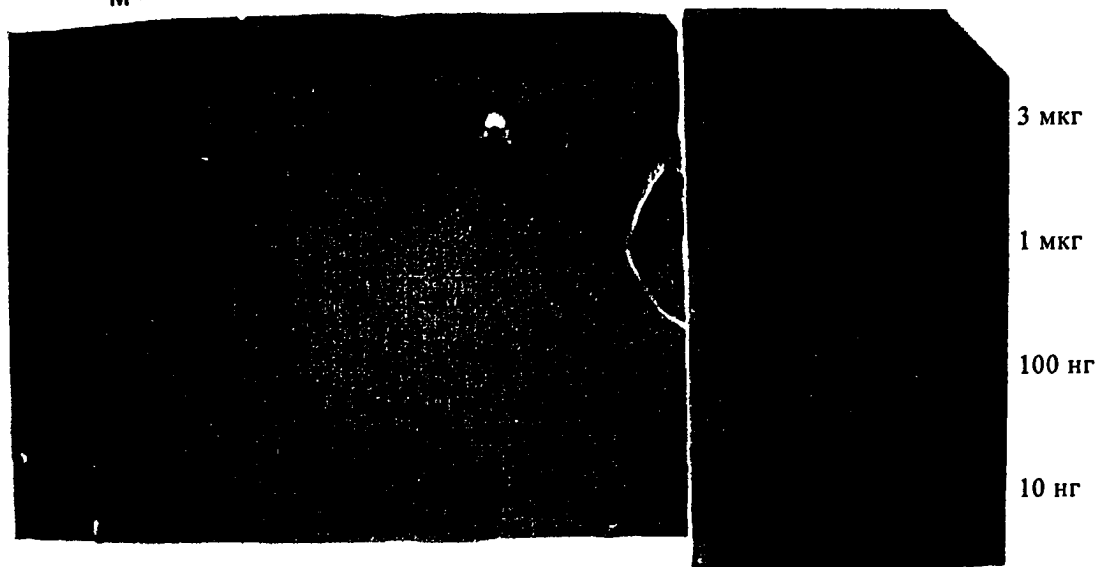
A β 29-40 (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

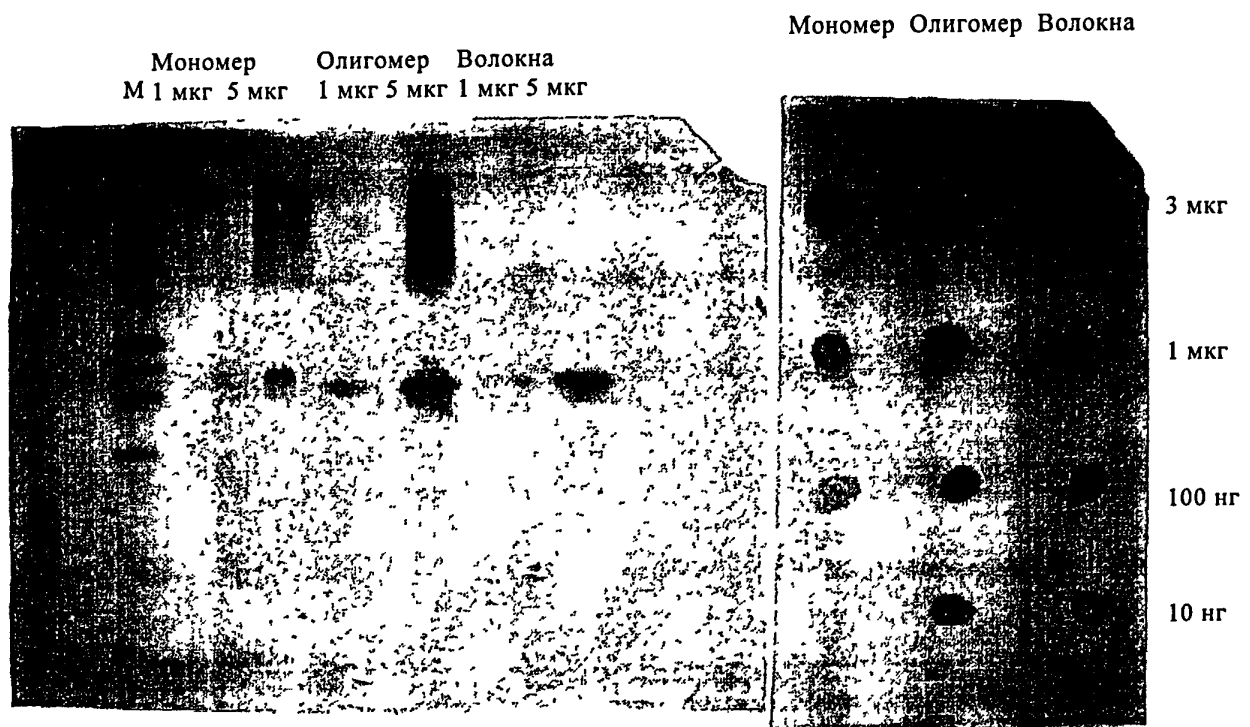
Фиг. 1

Мономер Олигомер Волокна
 M 1мкг 5мкг 1мкг 5мкг 1мкг 5мкг

Мономер Олигомер Волокна



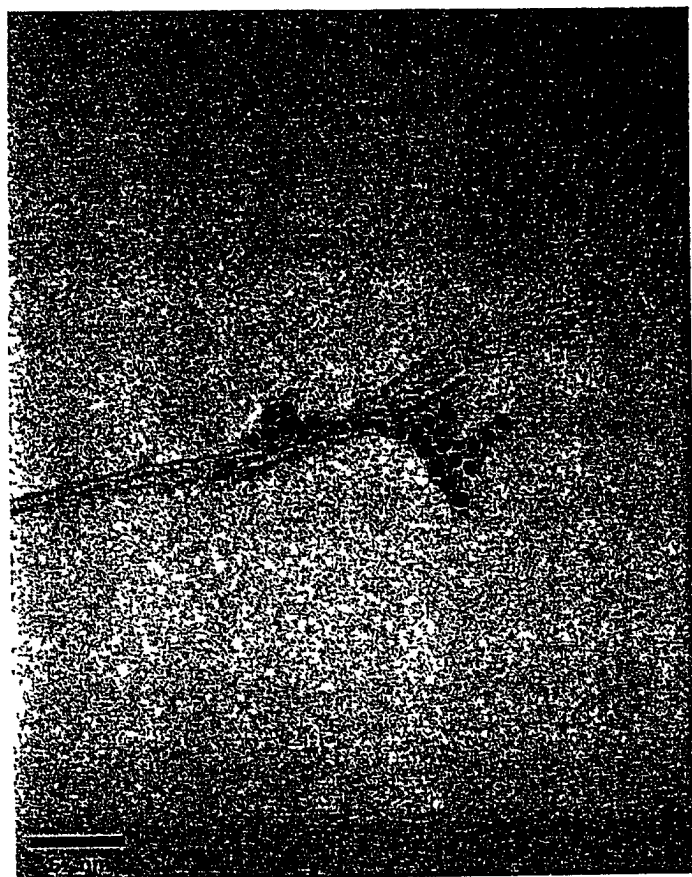
Фиг. 2а



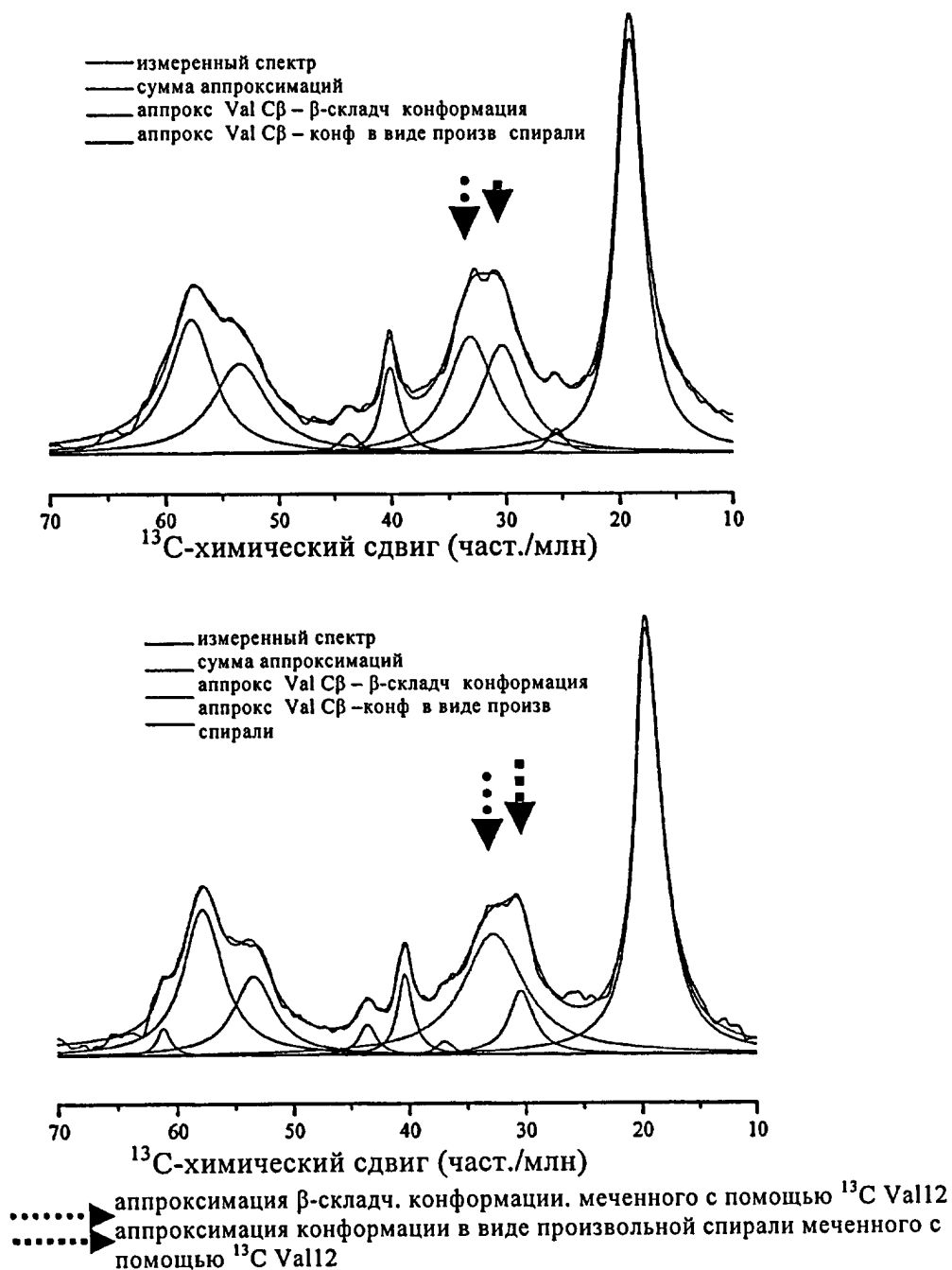
Фиг. 26



Фиг. 3а



Фиг. 36



Фиг. 4