

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **020979**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.03.31

(21) Номер заявки
200970694

(22) Дата подачи заявки
2008.01.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) ПЭГИЛИРОВАННЫЕ Fab-ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ К ПЕПТИДУ Aβ

(31) 60/885,439

(32) 2007.01.18

(33) US

(43) 2010.02.26

(86) PCT/US2008/050554

(87) WO 2008/088983 2008.07.24

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

(72) Изобретатель:
**Бейлз Келли Рене, Бумол Томас
Фрэнк, Чоу Чи-Кин, Дематтос
Рональд Брэдли, Хансен Райан
Джон, Кучибхотла Ума, Лу Цзижун,
Макдоннелл Питер Колон (US)**

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

(56) US-A1-2006257396
WO-A-2004071408

CHAPMAN ANDREW P.: "PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: A review", 20020617, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 531-545, XP001199533, page 532, right-hand column, paragraph 1 - page 534, right-hand column, paragraph 1 page 537, right-hand column, paragraph 3 - page 539, right-hand column, paragraph 1, page 542, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1, page 543, right-hand column, paragraph 2
WO-A-2006040153

(57) В изобретении описаны способы профилактики и лечения состояния, связанного с активностью пептида Aβ. В способе используют фрагменты гуманизированного антитела, которые специфично связывают пептид Aβ человека между положениями аминокислот 13 и 28, причем фрагменты антитела ковалентно связаны с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ).

B1

020979

020979

B1

Настоящее изобретение относится к фрагменту антитела, который связывает β -амилоидный пептид (А β) и ковалентно соединен с одной или более молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Пептид А β в циркулирующей форме состоит из 39-43 аминокислот (преимущественно 40 или 42 аминокислоты) и образуется после расщепления белка-предшественника амилоида (APP). Оказалось, что превращение А β из растворимой в нерастворимую форму с высоким содержанием β -листов и ее отложение в виде нейритических и цереброваскулярных бляшек в мозге связано с рядом состояний и заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию (ЦАА). Предотвращение и/или обращение отложения А β может лечить состояния, связанные с пептидом А β .

Терапевтические агенты, которые влияют на отложение, включают антитела к пептиду А β , например гуманизированные антитела и фрагменты, описанные в WO 2001/62801, WO 2004/071408 и Tamura, Y., et al., *Neurobiol. of Dis.* (2005) 20:541-545.

В то время как многие антитела и их производные можно применять в диагностике и терапии, фармакокинетики антител, идеальной для конкретного приложения, часто не удается достичь. Терапевтические антитела, созданные для противодействия различным состояниям и заболеваниям, связанным с пептидом А β , обычно представляют собой иммуноглобулины с целыми участками Fc. Участок Fc отвечает за продление периода полураспада антитела в плазме. Это продление может, однако, стать недостатком, поскольку защищает антитело, которое связано с целевым пептидом, от эффективного выведения, что приводит к циркуляции комплекса антиген-антитело в плазме в течение более длительного времени. Последующее введение антитела увеличивает дальнейшее накопление нежелательного комплекса в плазме. Участок Fc антитела может иметь некоторые нежелательные эффекторные функции и может нуждаться в модификации для устранения таких функций. Кроме того, участок Fc добавляет значительную массу к общему размеру терапевтической молекулы, что часто создает проблемы, связанные со способом введения, устройством доставки и масштабированием процессов производства.

Фрагменты антител без части Fc, включая Fab, исследовали *in vivo*, чтобы определить, могут ли такие фрагменты быть потенциальными терапевтическими агентами. Однако исследования показывают, что эффективность терапии с использованием фрагментов, таких как Fab, ограничена высокой скоростью выведения и коротким периодом полураспада. Соответственно существует потребность в активных молекулах терапевтических антител к пептиду А β , обладающих фармакокинетикой и фармакодинамикой, позволяющими улучшить режим дозирования и одновременно избежать возможных побочных эффектов, которые могут возникнуть как результат образования комплексов в плазме и потенциальных эффекторных функций.

Настоящее изобретение позволяет преодолеть ряд проблем, связанных с терапевтическими антителами или фрагментами антител, которые можно нацеливать на пептид А β . Соединения согласно настоящему изобретению охватывают фрагменты антител, которые связывают А β и ковалентно связаны с одной или более молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ). Такие соединения можно получать в системах бактериальных или дрожжевых клеток, что устраняет различные проблемы, связанные с получением антител в линиях клеток млекопитающих, такие как проблемы стабильности, очистки и загрязнения эндогенно продуцируемыми антигенами. Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению можно вводить подкожно, и они обладают идеальными профилями фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики (ФД), но в то же время сохраняют аффинность и избирательность фрагмента антитела к А β . Заявители неожиданно и к своему удивлению обнаружили также, что ковалентное присоединение молекул ПЭГ к гипервариабельному участку (CDR, ГВУ) фрагмента антитела не изменяло активность, аффинность или избирательность фрагмента антитела к А β .

Настоящее изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, который специфично связывает пептид А β человека между аминокислотными положениями 13 и 28, причем фрагмент антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ. Предпочтительно фрагмент антитела является Fab-фрагментом.

В одном варианте реализации изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, который содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи включает гипервариабельные участки со следующими последовательностями аминокислот: CDRL1: SSSQSLIYSDGNAYLH (SEQ ID NO: 6), CDRL2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 7) и CDRL3: TQSTHSPWT (SEQ ID NO: 8), и при этом вариабельная область тяжелой цепи включает гипервариабельные участки со следующими последовательностями аминокислот: CDRH1: GYTFSRYSMS (SEQ ID NO: 9), CDRH2: QINIRGCNTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 10) или QINIRGNNTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 11) и CDRH3: GDF (SEQ ID NO: 12). Предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с вариабельной областью тяжелой цепи или вариабельной областью легкой цепи фрагмента антитела. Более предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с гипервариабельным участком. Еще более предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с остатком цистеина в пределах гипервариабельного участка. Наиболее предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с CDRH2: QINIRGCNTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 10) вариабельной области тяжелой

цепи фрагмента антитела.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, который содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 1 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. Предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с переменной областью тяжелой цепи или переменной областью легкой цепи фрагмента антитела. Более предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с гиперпеременной участком переменной области тяжелой цепи фрагмента антитела. Еще более предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с остатком цистеина в пределах гиперпеременного участка переменной области тяжелой цепи фрагмента антитела. Наиболее предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с цистеином в аминокислотном положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает молекулу, включающую Fab-фрагмент или ScFv-фрагмент, причем Fab-фрагмент или ScFv-фрагмент ковалентно связан с молекулой ПЭГ и содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 1 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. Предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с цистеином в аминокислотном положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. Также предпочтительно в такой молекуле молекулярная масса ПЭГ составляет примерно от 0,5 кДа до 30 кДа, более предпочтительно 20 кДа.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела с переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 1 и переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, причем указанный фрагмент антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ 20 кДа в положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. Предпочтительно в такой молекуле молекула ПЭГ ковалентно присоединена малеимидной связью.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, специфически связывающий пептид Аβ человека между аминокислотными положениями 13 и 28, причем фрагмент антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ и содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 1 и переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 3. Предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с шарнирной областью фрагмента антитела. Более предпочтительно ПЭГ присоединен к шарнирной области малеимидной связью.

Изобретение также включает молекулу, содержащую фрагменты антитела, предпочтительно гуманизированные фрагменты антитела, причем с фрагментом антитела ковалентно связана молекула ПЭГ, что дает активную терапевтическую молекулу с фармакокинетикой и фармакодинамикой, обеспечивающими возможность еженедельного введения при снижении потенциальных побочных эффектов, которые могут возникнуть вследствие образования в плазме комплексов и сохранении или улучшении активности, аффинности и избирательности фрагмента антитела к Аβ.

Изобретение также включает способы лечения, предотвращения или обращения состояний или заболеваний, связанных с пептидом Аβ, включая клиническую и доклиническую болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, клиническую и доклиническую амилоидную ангиопатию (ЦАА), когнитивное расстройство, инсульт, кровоизлияние в мозг и общее снижение интеллектуальных способностей. Эти способы включают введение субъекту эффективного количества молекулы, описанной и заявленной в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, который специфично связывает пептид Аβ человека между аминокислотными положениями 13 и 28, в которой фрагмент антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ. Авторы обнаружили, что ковалентное связывание молекулы ПЭГ и фрагмента антитела, связывающего Аβ, не приводит к негативным изменениям активности, аффинности или селективности фрагмента антитела в отношении Аβ. Также неожиданно было обнаружено, что ковалентное присоединение молекулы ПЭГ, имеющей молекулярную массу вплоть до 20 кДа, к гиперпеременному участку фрагмента антитела, связывающего Аβ, также не приводит к негативным изменениям активности, аффинности или избирательности фрагмента антитела в отношении Аβ. Указанные фрагменты антитела можно вводить подкожно, и они имеют улучшенный профиль ФК/ФД для терапевтического использования, допускающий гибкий режим дозирования. Кроме того, указанные фрагменты антитела можно получать в системах бактериальных или дрожжевых клеток, что устраняет различные сложности, связанные с получением полноразмерных антител в клетках млекопитающих. ПЭГилированные фрагменты антитела согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность предотвращения и лечения как профилактического, так и терапевтического, связанных с Аβ пептидом состояний человека.

Полноразмерное антитело в том виде, в котором оно существует в природе, является молекулой иммуноглобулина, состоящей из четырех пептидных цепей: двух тяжелых цепей (H) (полный размер примерно 50-70 кДа) и двух легких цепей (L) (полный размер примерно 25 кДа), связанных дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область примерно из 100-110 или более аминокислот, отвечающую в основном за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть

каждой цепи определяет константную область, отвечающую в основном за эффекторную функцию.

Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда, и они характеризуются конкретной константной областью. Каждая легкая цепь состоит из N-концевой вариательной области легкой цепи (далее "LCVR") и константной области легкой цепи, состоящей из одного домена CL. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, они определяют изотип антитела: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно, причем некоторые из них подразделяются далее на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Каждый тип тяжелой цепи характеризуется конкретной константной областью. Каждая тяжелая цепь включает N-концевую вариательную область тяжелой цепи (далее "HCVR") и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена (CH1, CH2, и CH3) для IgG, IgD и IgA и 4 домена (CH1, CH2, CH3 и CH4) для IgM и IgE.

Области HCVR и LCVR далее можно подразделить на гиперварибельные участки, называемые также участками, определяющими комплементарность ("CDR"), которые перемежаются с более консервативными областями, характеризующими каркасные участки ("FR"). Каждая HCVR и LCVR образована тремя CDR и четырьмя FR, расположенными от amino- до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Три CDR тяжелой цепи называются "CDRH1, CDRH2 и CDRH3", три CDR легкой цепи называются "CDRL1, CDRL2 и CDRL3".

Гиперварибельные участки содержат большинство остатков, которые обеспечивают специфичное взаимодействие с антигеном. Нумерация и расположение аминокислотных остатков CDR в пределах областей HCVR и LCVR приведено в соответствии с хорошо известной принятой системой нумерации по Kabat.

Варибельная область каждой пары легкой и тяжелой цепей образует антигенсвязывающий сайт антитела. В настоящем изобретении термины "антигенсвязывающая часть", или "антигенсвязывающая область", или "антигенсвязывающий домен", или "антигенсвязывающий сайт" равнозначны и обозначают те части молекулы антитела, которые содержат остатки аминокислот, взаимодействующие с антигеном и обеспечивающие специфичность и аффинность антитела к антигену. Такая часть антитела включает "каркасные" остатки аминокислот, необходимые для поддержания соответствующей конформации антигенсвязывающих остатков. Предпочтительно каркасная область антител согласно настоящему изобретению является каркасной областью человеческого происхождения или по существу человеческого происхождения (по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% человеческого происхождения) и соответствует нумерации по Kabat. Кроме того, антигенсвязывающая область может быть получена из последовательности человека.

В настоящем изобретении термин "фрагмент антитела" относится к одному или более фрагментам антитела, сохранившим способность специфично связываться с антигеном (например, Aβ). Примеры охватываемых термином "фрагмент антитела" молекул антител включают (i) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент - двухвалентный фрагмент, включающий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одноплечевого антитела; и (v) dAb-фрагмент (Ward, et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH. Кроме того, хотя два домена VL и VH Fv-фрагмента кодируют отдельные гены, их можно соединить с использованием рекомбинантных методов посредством синтетического линкера, который позволяет получить из них единую белковую цепь, в которой домены VL и VH образуют одновалентную молекулу (называемую одноцепочечным Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science, 242:423-426 и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охватывает термин "фрагмент антитела". Другие формы одноцепочечных антител, таких как димерные антитела, также входят в определение "фрагмент антитела". Димерные антитела являются двухвалентными, биспецифическими связывающими белками, в которых домены VH и VL экспрессируются в виде единой полипептидной цепи, но используется линкер, который слишком короток, чтобы позволить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, в результате чего домены спариваются с комплементарными доменами другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure, 2:1121-1123).

Далее, антитело или фрагмент антитела может быть частью крупной иммуноадгезивной молекулы, образованной в результате ковалентного или нековалентного связывания антитела или фрагмента антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения молекулы тетрамерного scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol., 31: 1047-1058). Фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, могут быть получены из целых антител с использованием стандартных способов, таких как расщепление цельных антител пепсином или папаином соответственно. Кроме того, антитела, фрагменты антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных технологий рекомбинантных ДНК, хорошо известных в области техники. Антитела, фрагменты

антител и молекулы иммуноадгезии могут быть гликозилированными или негликозилированными, причем в обоих случаях они включены в объем изобретения. Предпочтительно фрагментом антитела является Fab-фрагмент.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое частично или полностью образовано последовательностью аминокислот, полученной из зародышевой линии антител человека, или перестроенной (rearranged) последовательностью, полученной путем изменения последовательности антитела, имеющего гипервариабельные участки не человека. Каркасные области вариабельных областей могут быть заменены на соответствующие каркасные области человека. Каркасные области человека включают геномные каркасные области, а также области, содержащие одну или более замен аминокислот. В частности, такие замены включают мутации, при которых аминокислота в конкретном положении в каркасной области человека заменена на аминокислоту из соответствующего положения природного каркаса гипервариабельного участка не человека. Например, содержащее гипервариабельные участки мыши гуманизированное антитело может содержать одну или более замен, при которых определенная аминокислота каркаса человека заменена на соответствующую аминокислоту каркаса мыши. Источники, более подробно описывающие способы гуманизации антител мыши, которые можно использовать, включают, например, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2869, 1991; патент США № 5693761; патент США № 4816397; патент США № 5225539; компьютерные программы ABMOD и ENCAD, описанные в Levitt, M., J. Mol. Biol., 168:595-620, 1983; гуманизацию можно осуществить, по существу, в соответствии со способом, описанным Winter et al. (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988).

Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению является фрагментом гуманизованного антитела. Более предпочтительно антитело согласно изобретению является Fab-фрагментом гуманизованного антитела.

Настоящее изобретение также включает фрагменты антител, ковалентно связанные с одной или более молекулами ПЭГ. Подразумевается, что термины "полиэтиленгликоль" и "ПЭГ" используются равнозначно и относятся к полиэтиленгликолю или его производным, известным в данной области техники (см., например, патенты США № 5445090, 5900461, 5932462, 6436386, 6448369, 6437025, 6448369, 6495659, 6515100 и 6514491). Предпочтительно ПЭГ ковалентно связан с одним или более остатков лизина или цистеина фрагмента антитела. Более предпочтительно ПЭГ ковалентно связан с одним или более остатков лизина или цистеина вариабельной области тяжелой цепи фрагмента антитела. Еще более предпочтительно ПЭГ ковалентно связан с одним или более остатков лизина или цистеина в пределах гипервариабельного участка фрагмента антитела. Наиболее предпочтительно ПЭГ связан с остатком цистеина в аминокислотном положении 56 вариабельной области тяжелой цепи указанной SEQ ID NO: 2. Кроме того, молекулы ПЭГ могут быть связаны с фрагментом антитела через молекулу линкера или спейсера в шарнирной области фрагмента антитела. Введение молекул линкеров и спейсеров в шарнирную область хорошо известно в данной области техники. Кроме того, ПЭГ можно ковалентно присоединить к модифицированным неприродным аминокислотам фрагмента антитела с помощью хорошо известных в данной области способов.

В типичной форме "ПЭГ" является линейным полимером с концевыми гидроксильными группами и имеет формулу $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, где n равно от примерно 8 до примерно 4000. Концевой водород может быть замещен защитной группой, такой как алкил или алканол (М-ПЭГ). Предпочтительно ПЭГ содержит по меньшей мере одну гидроксильную группу, более предпочтительно гидроксильную группу, расположенную на конце. Именно эту гидроксильную группу предпочтительно активируют для взаимодействия с пептидом. Для получения активного производного ПЭГ, содержащего подходящую для связывания с данной целевой молекулой функциональную группу, такую как активный карбонат, активный сложный эфир, альдегид, трезилат или ПЭГ-пропиональдегид, используют ряд химических модификаций. Затем осуществляют ковалентное связывание активированного производного ПЭГ с реакционноспособной группой лекарственного полипептида. Существует множество форм ПЭГ, которые можно применять в настоящем изобретении. В данной области техники существует множество производных ПЭГ, подходящих для использования в настоящем изобретении. Предполагается, что ковалентно связанная с фрагментом антитела согласно настоящему изобретению молекула ПЭГ не ограничена конкретным типом или размером. Молекулярная масса ПЭГ составляет предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 100 кДа, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 30 кДа и наиболее предпочтительно от примерно 1 до примерно 20 кДа. ПЭГ может быть линейным или разветвленным, и фрагмент антитела к пептиду Аβ согласно настоящему изобретению может иметь 1, 2, 3, 4, 5 или 6 молекул ПЭГ, связанных с пептидом. Наиболее предпочтительным является одна молекула ПЭГ на фрагмент антитела; однако, если присутствует более одной молекулы ПЭГ на молекулу пептида, предпочтительно, чтобы их было не более шести. Далее предполагается, что оба конца молекулы ПЭГ могут служить для перекрестного связывания вместе двух или более молекул фрагментов антител к Аβ-пептиду. Способы присоединения молекул ПЭГ к белкам, антителам и их фрагментам хорошо известны в данной области.

Термин "K_D" в настоящем изобретении относится к константе диссоциации конкретного взаимо-

действия антитело-антиген. Ее рассчитывают по формуле:

$$K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} \text{ (измеряется в М).}$$

Термин " k_{on} " в настоящем изобретении относится к константе скорости ассоциации или удельной скорости реакции, прямой реакции или образования комплекса, измеряемой в единицах $M^{-1}s^{-1}$. Термин " k_{off} " в настоящем изобретении относится к константе скорости диссоциации или удельной скорости реакции диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген, измеряемой в единицах s^{-1} .

Термин "специфично связывает" в настоящем изобретении относится к ситуации, в которой один член специфичной связывающейся пары не связывается в значительной степени с молекулами, отличными от своего партнера (партнеров) по специфичному связыванию. Данный термин применим, например, в случае, когда антигенсвязывающий домен антитела согласно настоящему изобретению специфичен в отношении конкретного эпитопа, который несет множество антигенов, в этом случае специфичное антитело, несущее антигенсвязывающий домен, будет способно связываться с различными антигенами, несущими данный эпитоп. Соответственно молекула согласно настоящему изобретению специфично связывает пептид A β и вместе с тем не связывает специфично APP. Кроме того, молекула согласно настоящему изобретению специфично связывает линейный, нелинейный или конформационный эпитоп A β , включающий аминокислоты HHQKLVFFAEDVGSNK (13-28) (SEQ ID NO: 4).

Термин "активность" в отношении молекул согласно настоящему изобретению включает, но не ограничивается, аффинность к эпитопу/антигену и специфичность способности нейтрализовать или противодействовать активности пептида *in vivo* или *in vitro* A β , IC₅₀, стабильность антитела *in vivo* и иммунные свойства антитела. Другие идентифицируемые биологические свойства или характеристики антитела, признанные в данной области, включают, например, перекрестную реактивность (то есть в общем случае связывание с гомологами целевого пептида, не являющегося пептидом человека, или с другими белками или тканями) и способность сохранять высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих. Указанные свойства или характеристики можно наблюдать, измерять или оценивать с использованием принятых в данной области техники методов, включая, но не ограничиваясь, твердофазный ИФА, конкурентный твердофазный ИФА, анализы поверхностного плазмонного резонанса Biacore или KinExA, тесты нейтрализации *in vitro* или *in vivo* без ограничений, связывание рецептора, продукцию и/или секрецию цитокинов или факторов роста, внутриклеточную передачу сигнала и иммуногистохимический анализ срезов тканей из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" равнозначно используются в настоящем изобретении в отношении млекопитающего, предпочтительно человека. В одной реализации настоящего изобретения субъект дополнительно характеризуется заболеванием, расстройством или состоянием, при котором будет полезно уменьшение активности пептида A β .

Выражения "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток хозяев" равнозначно используются в настоящем изобретении и включают индивидуальные клетки или культуру клеток, которые являются реципиентами любого выделенного (изолированного) полинуклеотида согласно настоящему изобретению или любого рекомбинантного вектора (векторов), включающего последовательности, кодирующие HCVR, LCVR или моноклональное антитело согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева включают потомков единственной клетки-хозяина. Потомки могут быть не полностью идентичны исходной родительской клетке по морфологии или общему содержанию ДНК из-за естественных, случайных или преднамеренных мутаций и/или изменений. Клетки-хозяева включают трансформированные клетки, трансдуцированные или инфицированные рекомбинантным вектором или полинуклеотидом, экспрессирующие фрагмент антитела согласно настоящему изобретению или легкую или тяжелую цепи такого антитела. Клетку-хозяина, которая содержит рекомбинантный вектор согласно настоящему изобретению, стабильно включенный в хромосому или нет, также можно назвать "рекомбинантной клеткой-хозяином". Предпочтительными клетками для получения клеток-хозяев согласно настоящему изобретению являются клетки CHO (например, ATCC CRL-9096), клетки NS0, клетки SP2/0, клетки COS (например, ATCC CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (ATCC CCL-2). Дополнительные клетки-хозяева для использования в настоящем изобретении включают клетки растений, дрожжей, других млекопитающих и прокариотические клетки. Более предпочтительно клетками для использования в настоящем изобретении являются клетки дрожжей или прокариотов.

Предполагается, что термин "состояние или заболевание, ассоциируемое с пептидом A β " или "заболевание, связанное с активностью A β " включает все состояния, расстройства и заболевания, которые связаны с 1) развитием бляшек β -амилоида в мозге, 2) синтезом аномальных форм A β , 3) образованием особенно токсичных форм A β или 4) аномальной скоростью синтеза, разложения или выведения A β . По объективным данным и предположениям с A β связаны такие состояния и заболевания, как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия, некоторые сосудистые деменции и умеренное когнитивное расстройство.

Настоящее изобретение обеспечивает молекулу, включающую фрагмент антитела, который специфично связывает пептид A β между аминокислотными положениями 13 и 28, причем указанный фрагмент

антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ. Фрагмент антитела является предпочтительно гуманизированным фрагментом антитела, таким как Fab-фрагмент и/или scFv-фрагмент. Наиболее предпочтительно фрагмент антитела является Fab-фрагментом. Специфичное связывание молекул согласно настоящему изобретению и пептида Аβ позволяет использовать указанные молекулы для терапии связанных с пептидом Аβ заболеваний и расстройств, то есть состояний, заболеваний и расстройств, при которых полезно ингибирование биологической активности пептида Аβ.

В одном варианте реализации изобретения фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область легкой цепи включает гиперпеременные участки со следующими последовательностями аминокислот: CDRL1: SSSQSLIYSDGNAYLH (SEQ ID NO: 6), CDRL2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 7) и CDRL3: TQSTHSPWT (SEQ ID NO: 8), и/или переменная область тяжелой цепи включает гиперпеременные участки со следующими последовательностями аминокислот: CDRH1: GYTFSRYSMS (SEQ ID NO: 9), CDRH2: QINIRGCNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 10) или QINIRGNNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 11) и CDRH3: GDF (SEQ ID NO: 12). Предпочтительно шесть гиперпеременных участков фрагмента антитела согласно настоящему изобретению существуют вместе. Сочетание, включающее гиперпеременные участки согласно настоящему изобретению, обычно представляет собой последовательность тяжелой или легкой цепи антитела или ее существенную часть, в которых гиперпеременные участки расположены в положении, соответствующем нумерации по Kabat. Каркасная область содержит три гиперпеременных участка для каждой цепи, тяжелой и легкой, в виде непрерывной последовательности, представленной следующей формулой: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Участки тяжелой или легкой цепи FR1, FR2, FR3 и FR4 вместе образуют полную каркасную область фрагмента антитела, если они размещены в виде непрерывной последовательности с гиперпеременными участками в установленном порядке. Предпочтительно каркасные области антитела согласно настоящему изобретению получены или имеют человеческое происхождение (т.е. получены/происходят из каркасной области человека) или, по существу, человеческое происхождение (т.е. более чем примерно на 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

Предпочтительно фрагмент антитела согласно настоящему изобретению включает LCVR, включающую пептид следующей последовательности:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSSSQSLIYSDGNAYLHWY¹LQKPGQSP
QLLIYKVSNRFS²GV³PD⁴RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV⁵G
VYYCTQSTHSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1);

и HCVR, включающую пептид с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из следующих последовательностей:

EVQLVESGGGLV¹KPGGSLRLS²CAASGYTFSRYSMSWVRQAPG
KGLEWVGQINIRGCNTYYPDTVKG³RFTISRDDSKNTLYLQMNS
LKTEDTAVYYCTTGDFWQG⁴GLTVTVSS (SEQ ID NO: 2);

EVQLVESGGGLV¹KPGGSLRLS²CAASGYTFSRYSMSWVRQAPG
KGLEWVGQINIRGNNTYYPDTVKG³RFTISRDDSKNTLYLQMNS
LKTEDTAVYYCTTGDFWQG⁴GLTVTVSS (SEQ ID NO: 3).

Кроме того, фрагмент антитела включает область LCVR, включающую пептид с последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 1, и HCVR, включающую пептид с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, при этом HCVR и LCVR сосуществует вместе в одном фрагменте антитела. Специалисту в данной области техники понятно, что фрагменты антитела согласно настоящему изобретению не ограничиваются конкретными последовательностями HCVR и LCVR, но также включают варианты этих последовательностей, присутствие которых в молекуле согласно настоящему изобретению не ухудшает или улучшает способность к связыванию антигена и по меньшей мере одно другое функциональное свойство родительского антитела, такое как специфичность к эпиту, способность конкурировать с родительским антителом за связывание с Аβ пептидом, значения IC_{50} и/или K_D или k_{off} для связывания пептида Аβ.

В другом варианте реализации согласно настоящему изобретению вся переменная область или часть переменной области ограничивается конкретной последовательностью LCVR, которая показана в SEQ ID NO: 1, и последовательностью HCVR, которая показана в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и дополнительно характеризуется тем, что оказывает антагонистическое действие или нейтрализует по меньшей мере один вид активности пептида Аβ in vivo или in vitro. Антитело согласно настоящему изобретению, в котором вся переменная область или ее часть ограничивается конкретной последовательностью, показанной в LCVR SEQ ID NO: 1 и HCVR SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 настоящего изобретения, дополнительно характеризуется способностью к специфичному связыванию пептида Аβ человека и отсутствием связывания APP человека.

В одном аспекте настоящего изобретения ПЭГ (или его производные) ковалентно связан с одним или более остатков лизина, цистеина или неприродной модифицированной аминокислоты фрагмента

антитела. Предпочтительно молекула ПЭГ ковалентно связана с переменной областью тяжелой цепи или переменной областью легкой цепи фрагмента антитела. Более предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с CDR переменной области тяжелой цепи фрагмента антитела. Наиболее предпочтительно такая молекула содержит молекулу ПЭГ, которая ковалентно связана с аминокислотой цистеином в аминокислотном положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. Кроме того, молекулы ПЭГ могут быть связаны с Fab-фрагментом антитела к пептиду Аβ при помощи молекулы линкера или спейсера в шарнирной области фрагмента антитела.

В другом аспекте настоящего изобретения молекула ПЭГ ковалентно связана с одним или более модифицированными остатками лизина, цистеина или неестественной модифицированной аминокислоты антитела согласно настоящему изобретению и замещает существующий в молекулах антитела фрагмент гликозилирования без значительного влияния на аффинность и избирательность фрагмента антитела к Аβ. Предпочтительно молекула ПЭГ заменяет сигнал гликозилирования в переменной области тяжелой цепи или переменной области легкой цепи фрагмента антитела. Более предпочтительно молекула ПЭГ заменяет сигнал гликозилирования в гиперпеременной области переменной области тяжелой цепи фрагмента антитела. Наиболее предпочтительно молекула ПЭГ заменяет сигнал гликозилирования в положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2.

Подразумевается, что ковалентно связанная с антителом молекула ПЭГ в настоящем изобретении не ограничена конкретным типом или размером. Молекулярная масса ПЭГ предпочтительно составляет от примерно 0,5 до примерно 100 кДа, более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 30 кДа и наиболее предпочтительно от примерно 1 до примерно 20 кДа. Кроме того, молекулярную массу ПЭГ можно выбрать из группы, состоящей из примерно 0,5, примерно 1, примерно 5, примерно 10 и примерно 20 кДа. ПЭГ может быть линейным или разветвленным и к ПЭГилированному антителу к пептиду Аβ согласно настоящему изобретению может быть присоединено более одной молекулы ПЭГ. Предпочтительно к ПЭГилированному антителу к пептиду Аβ присоединена одна молекула ПЭГ.

Наиболее предпочтительно молекула антитела по данному изобретению включает фрагмент антитела с переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 1 и переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, причем указанный фрагмент антитела ковалентно связан с молекулой ПЭГ массой 20 кДа в положении 56 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2.

Антигенный эпитоп пептида Аβ, с которым связываются антитела согласно настоящему изобретению, может быть линейным, нелинейным или конформационным эпитопом, который включает аминокислоты HHQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 4). Антитела, которые связывают указанный эпитоп, связывают пептид Аβ специфично и преимущественно по сравнению с тем, как они связывают APP. Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению связывают пептид Аβ по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз лучше (например, с большей аффинностью или большей специфичностью), чем они связывают APP человека; более предпочтительно по меньшей мере в 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 или 600 раз лучше, чем они связывают APP, еще более предпочтительно они не связывают APP на уровне большем, чем уровень фона, определенный, например, путем твердофазного ИФА, конкурентного твердофазного ИФА или по значению K_D в тестах *Biacore* или *KinExA*.

Фрагменты антител согласно настоящему изобретению связывают эпитоп между аминокислотами HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз лучше (например, с большей аффинностью или большей специфичностью), чем эпитоп, не включающий аминокислоты HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5). Более предпочтительно по меньшей мере в 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 или 600 раз лучше, чем эпитоп, не включающий аминокислоты HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5), еще более предпочтительно они вообще не связывают эпитоп, не включающий аминокислоты HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5), на уровне большем, чем уровень фона, определенный, например, путем твердофазного ИФА, конкурентного твердофазного ИФА или по значениям K_D в тестах *Biacore* или *KinExA*.

В предпочтительном варианте реализации изобретение обеспечивает фрагмент антитела, который обладает высокой аффинностью связывания с пептидом Аβ, то есть связывает пептид Аβ или его часть, включающую последовательность HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) [то есть антитело входит в контакт с полипептидом HQKLFFFAEDVGSNK] с аффинностью связывания (K_D) для пептида Аβ человека менее примерно 200, 100, 50, 40 или 30 пМ, предпочтительно менее примерно 20 пМ, измеренной методом *KinExA*. Кроме того, аффинность связывания (K_D) для пептида Аβ человека составляет от 0,1 до 200 пМ. Аффинность антитела можно определять так, как описано в примерах ниже или другими способами, доступными в данной области техники.

Вводить антитело согласно настоящему изобретению можно следующими путями: пероральным, парентеральным, ингаляционным или местно. Предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. Термин "парентеральный" в настоящем изобретении включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или внутрибрюшинное введение. Предпочтительной является системная периферическая доставка путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции. Бо-

лее предпочтительный способ введения антитела согласно настоящему изобретению представляет собой подкожную инъекцию. Подходящие инструменты для подобных инъекций хорошо известны в данной области техники.

Период полураспада фрагмента антитела согласно настоящему изобретению в плазме меньше, чем у соответствующего полноразмерного антитела к пептиду A β , и он выводится из плазмы быстрее, чем соответствующее полноразмерное антитело к пептиду A β . Кроме того, период полураспада антитела согласно настоящему изобретению в плазме больше, чем период полураспада соответствующего Fab-фрагмента антитела к пептиду A β , который не связан ковалентной связью с молекулой ПЭГ, и оно выводится из плазмы менее быстро, чем соответствующий Fab-фрагмент к пептиду A β , не связанный ковалентно с молекулой ПЭГ (примеры 1, 2 и 3). Термин "соответствующий" по отношению к антителу в настоящем изобретении относится к антителу с такими же областями LCVR и HCVR. Например, соответствующее полноразмерное антитело в отношении Fab-фрагмента антитела, имеющего области LCVR и HCVR, состоящие из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, должно иметь такие же LCVR и HCVR, состоящие из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 вместе с целым Fc-доменом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным полинуклеотидам, кодирующим антитела, которые при экспрессии содержат последовательности LCVR SEQ ID NO: 1 и HCVR, состоящую из SEQ ID NO: 2. По причине вырожденности кодонов эти последовательности могут быть заменены другими последовательностями полинуклеотидов. В частности, предпочтительные полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, кодирующие антитела, в случае экспрессии содержат последовательности легкой цепи CDR SEQ ID NO: 6-8 и тяжелой цепи CDR SEQ ID NO: 9, 10 или 11 и 12 или любую из переменных областей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3. Примеры последовательностей полинуклеотидов, которые кодируют LCVR SEQ ID NO: 1 и HCVR SEQ ID NO: 2, представлены в SEQ ID NO: 13 (LCVR) и SEQ ID NO: 14 (HCVR) соответственно.

Полинуклеотиды обычно включают дополнительно последовательность полинуклеотида, позволяющую контролировать экспрессию, функционально связанную с последовательностью, кодирующей гуманизированный иммуноглобулин, включая природные связанные или гетерологичные промоторные области.

Предпочтительно последовательности контроля экспрессии являются системами эукариотических промоторов в векторах, подходящих для трансформации или трансфекции эукариотических клеток, однако также можно использовать регуляторные последовательности прокариотических клеток. После внедрения вектора в подходящую линию клеток-хозяев, клетки-хозяева размножают в условиях, пригодных для экспрессии последовательностей нуклеотидов, при желании затем можно отбирать и очищать легкие цепи, тяжелые цепи, димеры легкой/тяжелой цепей или целые антитела, связывающие фрагменты или другие формы иммуноглобулинов.

Последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, подходящие для непрерывной экспрессии желаемого антитела или фрагмента антитела, можно получать из ряда других полинуклеотидов (геномных или кДНК, РНК, синтетических олигонуклеотидов и т.п.) и компонентов (например, областей V, J, D и C) с использованием любого из ряда известных способов. Соединение подходящих геномных и синтетических последовательностей является общеизвестным способом производства, но также можно использовать последовательности кДНК.

Последовательности ДНК константной области человека могут быть выделены в соответствии с хорошо известными процедурами из разнообразных клеток человека, но предпочтительно из иммортализованных В-клеток. Подходящие для последовательностей полинуклеотидов источники клеток и клетки-хозяева для экспрессии и секретиции иммуноглобулинов можно получать из множества источников, известных в данной области техники.

В дополнение к гуманизированным антителам или фрагментам антител, подробно описанным в настоящем изобретении, могут быть легко разработаны другие "по существу, гомологичные" модифицированные антитела, которые можно получать с использованием различных технологий рекомбинантных ДНК, хорошо известных специалистам в данной области. Например, каркасная область может отличаться от исходных последовательностей на уровне первичной структуры заменой нескольких аминокислот, концевыми и промежуточными вставками и делециями и т.п. Кроме того, в качестве основы для гуманизированных антител согласно настоящему изобретению можно использовать ряд других областей каркаса человека, отдельно или в сочетании. В общих чертах, модификации генов легко можно выполнить с помощью ряда известных методов, таких как сайт-направленный мутагенез.

Как было сказано ранее, экспрессия полинуклеотидов в хозяевах происходит после функционального связывания с последовательностью, регулирующей экспрессию (то есть после того, как полинуклеотид и контрольную последовательность объединяют для обеспечения функционирования). Эти векторы экспрессии обычно можно реплицировать в клетках-хозяевах или эписомах или в качестве составляющей ДНК хромосом хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать маркеры селекции, например гены устойчивости к тетрациклину или неомицину, для обнаружения клеток-хозяев, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать регули-

рующие экспрессию последовательности, например ориджин репликации, промотор, энхансер и необходимые для процессинга сайты, например сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминирования транскрипции. Предпочтительные регулирующие экспрессию последовательности представляют собой промоторы, полученные из генов иммуноглобулинов, SV40, аденовируса, вируса папилломы коров, цитомегаловируса и т.п.

Векторы, содержащие целевые последовательности полинуклеотидов (например, последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи и регулирующие экспрессию последовательности), можно переносить в клетку-хозяина с помощью хорошо известных методов, которые будут варьировать в зависимости от типа клетки. Для экспрессии антител согласно настоящему изобретению можно применять множество клеток-хозяев с использованием хорошо известных в данной области техники методов. Предпочтительные линии клеток включают COS, CHO, SP2/0, NS0 (доступны в публичных хранилищах, например ATCC - Американской коллекции типовых культур, Manassas, VA) и линии клеток дрожжей. Предпочтительно клетка-хозяин согласно настоящему изобретению включает один или более вектор или конструктор, включающие молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения. Клетка-хозяин согласно настоящему изобретению является клеткой, в которую введен вектор согласно настоящему изобретению, причем указанный вектор включает полинуклеотид, кодирующий LCVR согласно настоящему изобретению, и/или полинуклеотид, кодирующий HCVR согласно настоящему изобретению. Изобретение также обеспечивает клетку-хозяина, в которую введены два вектора согласно настоящему изобретению: один вектор содержит полинуклеотид, кодирующий область LCVR антитела согласно настоящему изобретению, а другой содержит полинуклеотид, кодирующий область HCVR антитела согласно настоящему изобретению, при этом каждый полинуклеотид функционально связан с последовательностью промотора. Типы клеток включают клетки млекопитающих, бактерий, растений и дрожжей. Предпочтительно клетка является клеткой линий CHO, COS, SP2/0 или NS0, дрожжевой клеткой или производной либо потомком любой клетки предпочтительного типа.

После экспрессии целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы иммуноглобулинов согласно настоящему изобретению можно очищать в соответствии со стандартными принятыми в данной области техники процедурами, включая осаждение сульфатом аммония, ионообменную, аффинную, обратнофазовую и гидрофобную хроматографии на колонках, гель-электрофорез и т.п. Для фармацевтического использования предпочтительны, по существу, чистые иммуноглобулины, гомогенность которых составляет по меньшей мере примерно 90, 92, 94 или 96%, наиболее предпочтительно от 98 до 99% или более. После частичной очистки или очистки до гомогенного состояния, по желанию, пептиды затем можно использовать в целях терапии или профилактики, как описано в настоящем изобретении.

Ряд симптомов, приводящих к когнитивным расстройствам, инсульту, кровоизлиянию в мозг и общему снижению умственных способностей, по всей видимости, связаны с содержащими пептид Аβ нейритными и цереброваскулярными бляшками в мозге. Среди этих состояний - как клиническая, так и доклиническая болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, клиническая или доклиническая амилоидная ангиопатия (ЦАА). Амилоидные бляшки состоят из пептида Аβ. Этот пептид циркулирует в крови и спинномозговой жидкости (ликворе) обычно в форме комплекса с липопротеинами. Циркулирующая форма пептида Аβ состоит из 39-43 аминокислот (в основном из 40 или 42 аминокислот) и образуется при расщеплении общего белка-предшественника, белка предшественника амилоида, часто называемого APP. Некоторые формы растворимого APP сами являются нейротоксичными и, возможно, определяют острую нейродегенерацию и/или когнитивного расстройства (McLean, C.A., et al., *Ann. Neurol.*, (1999) 46:860-866; Lambert, M.P., et al., (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.*, (2000) 283:1571).

Соответственно фармацевтическую композицию, включающую молекулу по настоящему изобретению, можно применять для лечения или предотвращения состояний, при которых присутствие пептида Аβ вызывает нежелательные патологические эффекты или вносит вклад в их развитие, или снижение активности пептида Аβ оказывает терапевтическое полезное действие на млекопитающих, предпочтительно людей, при состояниях, которые включают, без ограничения, клиническую или доклиническую болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, клиническую или доклиническую амилоидную ангиопатию (ЦАА), продромальную болезнь Альцгеймера, умеренное когнитивное нарушение (УКН) и когнитивное расстройство, инсульт, кровоизлияние в мозг и общее снижение интеллектуальных способностей, которые, как оказалось, связаны с нейритными и цереброваскулярными бляшками, содержащими пептид Аβ, в мозге. В изобретении предусмотрено использование молекул согласно настоящему изобретению для лечения или предотвращения по меньшей мере одного из указанных расстройств, при котором активность пептида Аβ является нежелательной или при котором полезно уменьшение уровня биоактивного пептида Аβ. Кроме того, предусмотрено использование молекул согласно настоящему изобретению в производстве лекарственных средств для лечения по меньшей мере одного из указанных расстройств.

Термины "лечение" и подобные термины в настоящем изобретении относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффектом может быть частичное или полное излечение заболевания и/или нежелательного эффекта, связанного с прогрессированием заболевания.

"Лечение" в настоящем изобретении включает введение соединения, в частности, человеку и включает (а) подавление заболевания, то есть прекращение его прогрессирования; или (б) снижение выраженности заболевания, то есть обращение заболевания или расстройства или снижение выраженности симптомов или их осложнений. Режимы дозирования (введения) можно скорректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, можно однократно вводить болюс, введение нескольких доз можно разделить во времени или можно пропорционально уменьшить или увеличить дозу, если это показано неотложными случаями при терапевтической ситуации.

Молекулу согласно настоящему изобретению можно включать в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъектам. Молекулы согласно настоящему изобретению можно вводить отдельно или в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, растворителем и/или наполнителем, в виде однократной или многократной доз. Фармацевтические композиции для введения приводят в соответствие с выбранным режимом введения; используют подходящие фармацевтически приемлемые растворитель, носитель и/или наполнители, такие как эмульгаторы, буферы, поверхностно-активные вещества, консерванты, солубилизаторы, изотонические вещества, стабилизаторы и т.п. (см., например, пример 14 ниже). Указанные композиции разработаны в соответствии со стандартными методами, такими как описаны в руководстве Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, которое представляет собой руководство по приготовлению форм, известных обычному специалисту в данной области.

Фармацевтическую композицию, включающую молекулу согласно настоящему изобретению, можно вводить субъекту при риске возникновения или после выявления вышеописанной патологии, используя стандартные способы введения, включая пероральное, внутривенное, внутривенное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, зашеечное или подязычное введение, или введение с использованием суппозитория. Предпочтительно молекулу согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту при риске возникновения или после выявления патологии, как описано в настоящем изобретении, путем подкожного введения.

Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно содержит "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" молекулы по изобретению. "Терапевтически эффективное количество" означает эффективное количество, дозировки и период времени, необходимые для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество молекулы можно изменять в соответствии с такими факторами, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума и способность молекулы приводить к желаемому ответу у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством является также такое количество, при котором любые терапевтически благоприятные эффекты перевешивают токсический или нежелательный эффект молекулы. "Профилактически эффективное количество" означает эффективное количество, дозировки и период времени, необходимые для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическая доза используется у субъекта до начала или на более раннем этапе заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество является, по меньшей мере, минимальной дозой, меньшей, чем токсичная доза активного агента, которую необходимо ввести субъекту для достижения благоприятного терапевтического действия. В соответствии с другим определением терапевтически эффективное количество молекул согласно настоящему изобретению - это количество, которое снижает активность пептида Аβ у млекопитающих, предпочтительно у людей, например, путем связывания пептида Аβ в случаях, когда присутствие пептида Аβ вызывает или способствует нежелательным патологическим эффектам или уменьшает количество самого пептида Аβ, оказывая на млекопитающее, предпочтительно человека, благоприятное терапевтическое действие.

Способ введения молекул согласно настоящему изобретению может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Предпочтительно антитела по изобретению можно вводить в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. Термин парентеральный в настоящем изобретении включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или внутривенное введение. Предпочтительной является периферическая системная доставка путем внутривенной или внутривенной или подкожной инъекции. Подкожная инъекция является наиболее предпочтительной. Подходящие инструменты для таких инъекций широко известны в данной области техники.

Фармацевтическая композиция обычно должна быть стерильной и стабильной при условиях производства и хранения в предусмотренном контейнере, включая, например, запечатанный флакон или шприц. Следовательно, после получения формы фармацевтические композиции, возможно, подвергаются стерильной фильтрации или делают приемлемыми с точки зрения микробиологии или иным способом. Типичная композиция для внутривенного вливания может иметь в составе до 250-1000 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, физиологический раствор, раствор декстрозы и раствор Хэнка, и терапевтически эффективную дозу терапевтического агента (например, от 1 до 100 мг/мл или более) для

доставки указанных ниже типичных доз. Доза может изменяться в зависимости от типа и тяжести заболевания. Как хорошо известно в медицине, дозировка для любого субъекта зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие применяемые параллельно лекарства. Типичная дозировка может быть, например, в диапазоне от 0,001 до 1000 мкг; тем не менее, предусмотрены дозировки ниже или выше этого примерного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов. При режиме ежедневного парентерального введения дозировка может составлять от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 100 мг/кг общей массы тела, предпочтительно от примерно 0,3 мкг/кг до примерно 10 мг/кг и более предпочтительно от примерно 1 мкг/кг до 1 мг/кг, еще более предпочтительно от примерно 0,5 до 10 мг/кг массы тела в день. Прогресс можно отслеживать путем периодической оценки. Для регулярного введения в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, введение повторяют, пока не произойдет желаемое подавление симптомов болезни. Тем не менее, настоящее изобретение не исключает других режимов дозирования, которые можно применять. Желаемую дозу можно доставлять путем однократного болюсного введения, многократного болюсного введения или путем непрерывной инфузии молекулы в зависимости от профиля фармакокинетики разложения, которую врач хочет получить.

Предложенные количества молекул согласно настоящему изобретению можно варьировать в зависимости от терапевтической необходимости. Ключевым фактором при выборе подходящей дозы и планировании является полученный результат. Факторы для рассмотрения в этом контексте включают конкретное расстройство, которое лечат, конкретное вскармливающее, подвергающееся лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причину расстройства, место доставки антитела, конкретный тип антитела, способ введения, расписание введения и другие факторы, известные в медицинской практике.

Терапевтические агенты согласно изобретению для хранения можно замораживать или лиофилизировать и восстанавливать перед использованием в пригодном стерильном носителе. Лиофилизация и восстановление могут привести к варьирующей потере активности антитела. Соответственно возможна корректировка дозировок.

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, но не ограничения настоящего изобретения. В приведенных ниже примерах используются, среди прочих, моноклональное антитело мыши, названное "266" (m266), которое первоначально получили в результате иммунизации мыши пептидом, образованным остатками 13-28 пептида Аβ человека, и Fab-фрагмент моноклонального антитела мыши 266 (m266-Fab). Подтверждено, что антитело обладает иммунореактивностью в отношении данного пептида. Получение m266 было описано ранее. Для ковалентного присоединения молекулы ПЭГ к m266-Fab Fab можно модифицировать с введением остатка цистеина в CDR2 (N56C) варибельной области тяжелой цепи и ПЭГилирования показанным ниже способом (пример 4). Поскольку примеры описывают эксперименты, проведенные на системах с использованием мышей, необходимо использование моноклональных антител мыши. Тем не менее, в способах лечения по настоящему изобретению, предназначенных для использования у человека, предпочтительны гуманизированные формы антител согласно настоящему изобретению или их фрагменты. В примерах, ниже, 1A1-Fab относится к гуманизированному фрагменту антитела Fab, который включает LCVR SEQ ID NO: 1 и HCVR SEQ ID NO: 2.

Пример 1. Изучение фармакокинетики и фармакодинамики m266-Fab ПЭГ при подкожном введении мышам PDAPP.

Для исследования фармакокинетики/фармакодинамики в плазме антитела и комплекса антитело/пептид Аβ использовали молодых (3-месячных) трансгенных мышей PDAPP. Исследованные антитела включали 266 Fab (m266-Fab) мыши, m266-Fab+5 кДа ПЭГ, m266-Fab+10 кДа ПЭГ, m266-Fab+20 кДа ПЭГ и полноразмерное антитело m266 IgG. Мышам PDAPP +/- подкожно вводили 1 мг/кг антитела и затем в следующие моменты времени отбирали плазму крови: 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168 и 240 ч спустя после введения. Животных, получавших антитело m266-Fab, анализировали в дополнительных ранних временных точках отбора плазмы из-за быстрого разложения этой молекулы. Точки отбора для m266-Fab были спустя 1, 4, 8, 12, 16, 24 и 48 ч после введения. В общей сложности на антитело в один момент времени анализировали по пять животных. Цельную кровь получали путем прокола сердца иглами 23 размера, надетыми на 1СС шприцы, предварительно промытые 0,5 М ЭДТА. Образцы крови во время процедуры выделения держали на ледяной бане и затем центрифугировали при 14000 об/мин в охлаждающей центрифуге при 4°C в течение 15 мин. Полученные образцы плазмы аликвотировали и хранили при -80°C.

А. Методология анализа фармакокинетики Fab.

Концентрацию Fab в плазме определяли методом захвата антигена в твердофазном ИФА. Вкратце, планшеты в течение ночи при 4°C или 1 ч при 37°C покрывали конъюгатом Аβ-БСА, затем блокировали с помощью казеинового буфера Пирке. В планшеты вносили стандарты, контрольные и анализируемые образцы и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Для обнаружения использовали конъюгированные с HRP Аβ козы к иммуноглобулинам мыши, а колориметрический ответ получен с субстратом OPD. Планшеты сканировали при оптической плотности A493 относительно A700. Концентрацию иммунореактивных молекул в образцах плазмы определяли по стандартным кривым, полученным с известно-

го количества m266 Fab в плазме крови мыши, используя 4/5-параметрический алгоритм. Анализируемый диапазон составлял для m266 Fab от 0,05 до 0,5 мкг/мл. Диапазон для ПЭГилированных Fab составлял от 0,075 до 0,8 мкг/мл.

Концентрацию иммунореактивных молекул в образцах плазмы определяли по стандартным кривым, полученным с известного количества m266 Fab в плазме крови мыши, используя 4/5-параметрический алгоритм. Анализируемый диапазон составлял для m266 Fab от 0,05 до 0,5 мкг/мл. Диапазон для ПЭГилированных Fab составлял от 0,075 до 0,8 мкг/мл. Результаты ясно демонстрировали, что добавление молекулы ПЭГ и увеличение размера молекулы ПЭГ увеличивает удерживание ПЭГилированных Fab в плазме (2545 нг/мл спустя 8 ч для 20 кДа ПЭГилированного m266-Fab) по сравнению с не-ПЭГилированным m266-Fab (350 нг/мл спустя 8 ч).

В. Твердофазный ИФА-тест на m266 к Аβ.

Для измерения количества пептида Аβ в плазме в отсутствие или в присутствии терапевтического антитела (полноразмерного или Fab-фрагмента) разработали и использовали твердофазные ИФА-тесты. Измеряемые в этих тестах пептиды Аβ представляли собой полноразмерный Аβ1-40 или Аβ1-42. 96-луночные планшеты для твердофазного ИФА Immulon 4HBX (ThermoLabsystems) в течение ночи покрывали при 4°C захваченным за С-конец антителом (m2G3 для планшета Аβ40 или m21F12 для планшета Аβ42) в 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 100 мкл на 1 лунку). Тестовый планшет закрывали для предохранения испарения во время инкубации в течение ночи. На следующий день из лунок удаляли раствор и лунки 3 раза промывали ФСБ (400 мкл на 1 лунку) с помощью промывочного устройства для 96-луночных планшетов Labsystems. Добавляли блокирующий буфер (360 мкл 1% молочно-ФСБ) и инкубировали планшеты при 37°C в течение 1 ч. Образцы подготавливали путем растворения плазмы в растворителях, получая следующее: 20% плазма, 0,5 М гуанидин, 5 мМ Tris pH 8,0, 0,5X коктейль ингибиторов протеаз, 25 мкг/мл m266 и ФСБ. Объем использованной в тесте плазмы в определенный момент может нуждаться в уменьшении из-за высоких уровней присутствующего пептида Аβ, и в этих случаях остаточный объем плазмы корректировали плазмой крысы (конечный объем поддерживали на уровне 20%). Стандарты пептида Аβ с концентрацией, варьирующей от 250 до 3,9 пг/мл, получали в стандартном растворителе (20% плазмы крысы, 0,5 М гуанидин, 5 мМ Tris pH 8,0 и 0,5X полностью свободный от ЭДТА коктейль-ингибитор протеаз (Roche Diagnostics), 25 мкг/мл m266 и ФСБ). Добавление 25 мкг/мл интактного m266 в образцы и стандартные растворители требуется для того, чтобы нейтрализовать любое негативное влияние, которое могут оказывать в тесте уровни вариабельности центральных доменов антител. После блокировки планшеты 4 раза промывали ФСБ. Образцы и стандарты в трех повторах загружали на планшеты (100 мкл на 1 лунку), планшеты закрывали и сутки инкубировали при 4°C. На следующее утро планшеты 4 раза промывали ФСБ-Т (ФСБ+0,05% Tween-20) и в лунки на 2 ч при комнатной температуре добавляли биотинилированное вторичное антитело m3D6 (100 мкл на 1 лунку, разбавляли 0,5% БСА/ФСБ-Т). Затем планшеты 4 раза промывали ФСБ-Т, инкубировали с конъюгатом стрептавидин-поли-HRP (1:5000 в 0,5% БСА/ФСБ-Т) в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Планшеты 4 раза промывали ФСБ-Т и добавляли в лунки по 100 мкл субстрата ТМВ (Sigma). Развитие окрашивания отслеживали при 650 нм спустя 15, 30 и 60 мин.

Таблица 1

Результаты фармакодинамики: средняя концентрация в плазме Аβ 40 (пг/мл)

Время (ч)	m266 Fab	m266 Fab+5 кДа ПЭГ	m266 Fab+10 кДа ПЭГ	m266 Fab+20 кДа ПЭГ	Исходное m266
1	246,7	253,5	178,4	196,3	223,7
4	498,8	693,2	898,1	816,6	1110
8	576,7	997,8	1011	1259	1852
12	530,9				
18	344,1				
24	181,2	914,7	1728	2966	6919
48		200,1	789,6	2642	8557
96		79,1	104,8	329,3	10792
168		62,64	76,49	143,3	9923
240		50,14	98,24	101,2	6114

В дополнение к более гибкому режиму дозирования, который можно менять в зависимости от размера ПЭГ, результаты демонстрируют, что комплекс антигена с ПЭГилированным Fab не накапливается в плазме на протяжении продолжительного времени подобно интактному антителу (интактному m266). Интактное антитело продлевает период полураспада антитела в плазме и приводит к циркуляции комплекса антиген/антитело в плазме на протяжении продолжительного времени (>240 ч). Исходный Fab (m266 Fab), с другой стороны, имеет быструю скорость выведения и короткий период полураспада (<24 ч), который ограничивает их применение в терапии. Наоборот, как показано в табл. 1, ПЭГилированные Fab дают молекулу антитела с фармакокинетикой и фармакодинамикой, которая позволяет улучшить режим дозирования.

Пример 2. Изучение фармакокинетики и фармакодинамики 1A1-Fab ПЭГ на мышах PDAPP.

Для исследования фармакокинетики/фармакодинамики в плазме антитела и комплекса антитело-пептид Aβ использовали молодых (3-месячных) трансгенных мышей PDAPP. Исследованные антитела включали гуманизированные 1A1-Fab, 1A1-Fab+5 кДа ПЭГ, 1A1-Fab+10 кДа ПЭГ и 1A1-Fab+20 кДа ПЭГ. Мышам PDAPP +/- подкожно вводили 1 мг/кг антитела и затем в определенные моменты времени отбирали плазму крови в зависимости от типа введенного антитела. Для различных антител использовали следующие моменты времени:

1A1-Fab - кровь брали спустя 1, 4, 8, 12, 18, 24 и 48 ч после введения;

1A1-Fab+5 кДа ПЭГ - кровь брали спустя 1, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 ч после введения;

1A1-Fab+10 кДа ПЭГ - кровь брали спустя 1, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 ч после введения;

1A1-Fab+20 кДа ПЭГ - кровь брали спустя 1, 8, 24, 48, 96, 168 и 240 ч после введения.

В общей сложности на антитело в один момент времени анализировали по пять животных. Полученные образцы плазмы аликвотировали и хранили при -80°C.

А. Методология анализа фармакокинетики Fab.

Концентрацию 1A1 Fab в плазме определяли с использованием твердофазного сэндвич-ИФА. Планшеты покрывали антителами козы к к-цепи IgG человека; в планшеты вносили стандарты, контрольные и анализируемые образцы и затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для обнаружения использовали антитела козы к IgG человека, добавляя OPD для колориметрического ответа. Планшеты сканировали при оптической плотности A493 по отношению к A700.

Концентрацию в образцах плазмы определяли по стандартным кривым, полученным с известного количества 1A1 Fab в плазме крови мыши, используя 4/5-параметрический алгоритм; анализируемый диапазон для Fab и Fab-ПЭГ 5 кДа составлял от 0,003 до 0,3 мкг/мл; для Fab-ПЭГ 10 кДа составлял от 0,006 до 0,2 мкг/мл и от 0,04 до 0,4 мкг/мл; для Fab-ПЭГ 20 кДа составлял от 0,02 до 0,4 мкг/мл и от 0,04 до 0,4 мкг/мл. Результаты ясно демонстрировали, что добавление молекулы ПЭГ и увеличение размера молекулы ПЭГ увеличивает удержание ПЭГилированных Fab в плазме (77 нг/мл спустя 96 ч для 20 кДа ПЭГилированного 1A1 Fab) по сравнению с не-ПЭГилированным 1A1 Fab (не обнаруживается спустя 24 ч).

В. Твердофазный ИФА тест на 1A1 Aβ.

Твердофазный ИФА был, по существу, таким же, как и описанный выше для m266. Образцы готовили путем растворения плазмы в растворителях, получая следующее: 20% плазма, 0,5 М гуанидин, 5 мМ Tris pH 8,0, 0,5X коктейль ингибиторов протеаз, 20 мкг/мл 1A1 и ФСБ. Измеряемые в этих тестах пептиды Aβ представляли собой полноразмерный Aβ1-40 или Aβ1-42. Развитие окрашивания отслеживали при 650 нм спустя 15, 30 и 60 мин. Результаты представлены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Результаты фармакодинамики: средняя концентрация в плазме Aβ 40 (нг/мл)

Время (ч)	1A1 Fab	1A1 Fab+5 кДа ПЭГ	1A1 Fab+10 кДа ПЭГ	1A1 Fab+20 кДа ПЭГ
1	136,8	117,1	116,3	111,2
4	153,6	208,2	281,6	
8	96,65	198,4	406,3	529,2
12	131,9			
18	105,9			
24	114,7	133,6	585,1	1243
48	106,8	95,12	170,7	642
96		88,48	113,7	177,9
168		93,96	110,8	125,4
240				200

Аналогично случаю m266 Fab в примере 1 данные из табл. 2 демонстрируют, что гуманизированные Fab с ковалентно присоединенной молекулой ПЭГ также обеспечивают идеальный профиль ФК/ФД, учитывающий гибкий режим дозирования для предотвращения накопления комплекса антитело-антиген в кровотоке в течение длительного времени.

Пример 3. Очистка антитела мыши 266 и гуманизированных аналогов 1A1 Fab.

Супернатанты из культур клеток, трансфицированных генами 266 Fab мыши или гуманизированного 1A1 Fab и аналогов, очищали с использованием двухэтапной хроматографии, состоящей из катионообменной хроматографии и эксцизионной хроматографии на смоле Superdex 75 (GE Healthcare). По окончании очистки культуральный супернатант концентрировали с использованием TFF и диализировали против 20-кратного избыточного объема 10 мМ ацетата натрия pH 5 в течение ночи при 4°C. Осадок удаляли центрифугированием и супернатант проводили через слой SP сефарозы (GE Healthcare), заряженный 10 мМ ацетатом натрия pH 5. Колонки промывали 10 мМ ацетатом натрия pH 5, содержащим последовательно возрастающее количество NaCl до тех пор, пока элюировался Fab-фрагмент, приблизи-

тельно от 90 до 110 mM NaCl. Содержащие активный Fab-фрагменты определяли и собирали вместе. Уменьшали объем и заменяли буфер (ФСБ) при помощи центрифужного концентрирующего устройства (Millipore). Конечный объем доводили до 13 мл и загружали на разделяющие по размеру колонки Superdex 75. Содержащие Fab-фрагменты фракции элюировали примерно при 50 кДа, определяли и собирали вместе для дальнейшего исследования и ПЭГилирования.

Пример 4. ПЭГилирование и исследование *in vitro*.

Цистеин N56C в очищенном из культуры клеток фрагменте 1A1-Fab блокировали для ПЭГилирования. Для избирательного восстановления цистеина N56C использовали бусины Pierce's Reduce-IMM™. Восстанавливающие бусины извлекали из колонки, поставленной производителем, и использовали в периодическом режиме. Бусины (~4 мл) сначала активировали 8 мл 10 mM DTT в буфере Reduce-IMM Equilibration #1 (фосфат натрия + ЭДТА, pH 8,0) в течение 30 мин. Бусины затем 3 раза промывали ФСБ. К бусинам добавляли 18 мл 1A1 N56C Fab в ФСБ pH 7,4 (1,7 мг/мл) и к смеси добавляли 10 mM ЭДТА. Смесь перемешивали вращением и оставляли при комнатной температуре на 4-5 ч. От бусин отделяли Fab, используя разделитель смолы Handee™, бусины промывали ФСБ. Фракции смыва и Fab объединяли и обрабатывали 5-кратным мольным избытком ПЭГ-малеимида (20 кДа ПЭГ от NOF; 10 кДа ПЭГ от Sunbio; 5 кДа ПЭГ от Nektar) в течение 1 ч. Реакционную смесь диализовали против 4 л буфера 10 mM ацетата натрия pH 5,0 так, чтобы Fab и Fab-ПЭГ можно было удержать на колонке с SP сефарозой, которую уравнивали 10 mM буфером ацетата натрия pH 5,0. Непрореагировавшие Fab и Fab-ПЭГ элюировали в градиенте соли. Их элюировали при концентрации NaCl от 50 до 70 mM. Белок далее очищали путем эксцизионной хроматографии (колонки Superdex75, GE Healthcare) с ФСБ в качестве подвижной фазы. Масштабировали в сторону увеличения или уменьшения объема. Аналогичные способы можно использовать для получения ПЭГилированного антитела мыши 266 Fab N56C.

Для подтверждения присоединения к Fab молекулы ПЭГ образцы исследовали путем эксцизионной хроматографии. Эксцизионную хроматографию проводили на колонках TSK G3000PW XL (Tosoh Bioscience). Колонки прогоняли со скоростью 0,5 мл/мин ФСБ и 0,35 M NaCl (pH 7,4), используя серию аналитической ВЭЖХ Agilent HP1100, работающую при 214 нм. Кроме того, образцы проанализировали путем SDS-ПААГ. На 4-12% NuPage® гель с Bis-Tris загружали 10 мкг очищенного материала и окрашивали с помощью SimplyBlue™ SafeStain.

Пример 5. Измерение кинетических констант методом Biacore.

Для измерения кинетики связывания также использовали прибор Biacore® 2000. Biacore® использует оптические свойства поверхностного плазмонного резонанса для обнаружения изменения концентрации взаимодействующих молекул белка в пределах декстрановой биосенсорной матрицы. Кроме отмеченных, все реагенты и материалы приобретались в Biacore® AB (Uppsala, Sweden). Все измерения проводили при 25°C. Образцы растворяли в буфере HBS-EP вещества (150 mM хлорид натрия, 3 mM ЭДТА, 0,005% (мас./об.) поверхностно-активного вещества P-20 и 10 mM HEPES, pH 7,4). Антитела козы к к-цепи человека иммобилизовались на клетках от 1 до 4 на сенсорном чипе CM5 на уровне 8000 единиц ответа (ЕО) с использованием связывающего амина набора.

Связывание оценивали с использованием множественных циклов анализа. Каждый цикл проводили при скорости течения 50 мкл/мин, и он состоял из следующих этапов: инъекция ~20 мкл связывающей антитела композиции при 10 мкг/мл, приводящая к захвату 400-500 ЕО, инъекция 250 мкл пептида Аβ человека (1-40) (начиная с 200 нМ и используя двукратные последовательные разбавления для каждого цикла), затем 20 мин для диссоциации и регенерация с использованием ~30 мкл 10 mM гидрохлорида глицина pH 1,5. Скорости ассоциации и диссоциации для каждого цикла оценивали с использованием модели "1:1 (Лэнгмюровского) связывания" с помощью программного обеспечения BIAevaluation. Результаты показывают, что ПЭГилирование в сайте N56C имеет небольшое влияние на аффинность Fab к Аβ пептиду человека.

Пример 6. Измерение константы равновесия методом KinExA.

Анализ KinExA использовали как независимый подход к измерению аффинности связывания путем равновесного анализа из-за медленной скорости разложения комплекса антигена и Fab. Для измерения кинетики связывания использовали прибор KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.). Вкратце, антиген ковалентно связывали с бусинами из сефарозы, на приборе обнаруживали связывание свободных Fab/Fab-ПЭГ с бусинами. Для измерения K_D отдельные пробирки, содержащие Fab/Fab-ПЭГ (20 или 500 пМ для 1A1-Fab-20 кПЭГ, 5 или 50 пМ для 1A1 Fab) с серийно разбавленным антигеном - растворимым пептидом Аβ человека (1-40) (0-10 нМ) инкубировали в течение 30-50 ч при 37°C в содержащем 1 мг/мл БСА ФСБ для гарантированного достижения равновесия. После инкубации в каждом равновесном образце на KinExA 3000 определяли величину свободного Fab/Fab-ПЭГ в соответствии с инструкциям изготовителя. Величины K_D определяли путем n-Curve анализа кривых с использованием программного обеспечения KinExA 3000. Результаты показали, что 1A1 Fab хорошо связывается с пептидом Аβ человека (19 пМ) с аффинностью ~10-кратно выше по сравнению с 266 Fab мыши (240 пМ). Кроме того, ковалентное присоединение 20К ПЭГ в сайте N56C не имеет влияния на аффинность 1A1-Fab (12 пМ).

Пример 7. Тест на связывание белка-предшественника амилоида (APP) с помощью твердофазного клеточного ИФА.

Для оценки перекрестной реактивности 266 Fab/mAb с белком-предшественником APP использовали стабильно экспрессирующие APP клетки НЕК 293 (аминокислоты 1-751). Эти клетки получили путем клонирования гена APP (1-751) в плазмиду, содержащую маркер устойчивости к неомицину. Рекомбинантной плазмидой трансфицировали клетки НЕК 293 и отбирали трансфектантов при 200 мкг/мл G418 для получения стабильно экспрессирующей клеточной линии. Для теста на связывание в каждую лунку покрытого PDL 96-луночного планшета помещали 75000 клеток APP 751. После инкубации в течение 2 дней в ростовой среде (DMEM F12, 5% FBS, 10 mM Hepes pH 7,5, 200 мкг/мл G418) жидкость удаляли и добавляли 20 мкг/мл Fab или mAb в ФСБ (с Ca/Mg), содержащем 10 мг/мл БСА. Связывание продолжалось 2 ч при 4°C, клетки трехкратно промывали 10 мг/мл БСА. В ФСБ/БСА (Southern Biotech) добавляли вторичное антитело (антитело к легкой цепи, конъюгированное с пероксидазой хрена (hrp)), специфичное к легким цепям человека или мыши. Для антител к легкой цепи человека использовали разбавление 1:5000 в ФСБ/БСА и 1:2000 для легкой цепи мыши. После 1 ч инкубации при 4°C клетки пятикратно промывали ФСБ/БСА. После добавления субстрата ТМВ в течение 10 мин измеряли активность Hrp как функцию от связывания Fab/mAb и APP. Реакционную смесь переносили на чистый 96-луночный планшет и измеряли оптическую плотность при 650 нм. Данные показали, что ПЭГилированные (5, 10 и 20 кДа) 1A1-Fab и m266-Fab проявляют избирательность к A β -пептиду по отношению к APP.

Перечень последовательностей

<110> ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ
 БЕЙЛЗ, Келли Р.
 Бьюмол, Томас Ф.
 Чоу, Чи-Кин
 Дематтос, Рональд В.
 Хансен, Райан
 Кучибхолта, Ума
 Лу, Жиронг
 МакДоннел, Питер

<120> ПЭГИЛИРОВАННЫЕ FAB-ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ К ПЕПТИДУ АВ

<130> X17087

<150> US 60/885439
 <151> 2007-01-18

<160> 14

<170> Патентная версия 3.4

<210> 1
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 1

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
 20 25 30

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

020979

Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Gln Ser
85 90 95

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

<210> 2
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> искусственная

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 2

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

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

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

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 3

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> искусственная

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 3

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

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

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

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

020979

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

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 4
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> искусственная

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 6

Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 8

Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 9

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser
 1 5 10

<210> 10
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 10

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 11

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 3
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 12

Gly Asp Phe

1

<210> 13

<211> 657

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 13

```

gacatcggtta tgaactcagac tccattgtcc ttgtctgtta ctccagggtca accagcttct      60
atttcctggtt cctcctccca atctttgac tactccgacg gtaacgctta cttgcactgg      120
tacttgcaaa agcctgggtca atccccacaa ttgttgatct acaagggttc caacagattc      180
tctgggtgttc ctgacagatt ttctgggtcc ggttcggta ctgacttcac ttggaagac      240
tccagagttg aagctgagga tgttgggtgt tactactgta ctcagtcac tcattcccca      300
tggacttttg gtgggtgtac taagggtgag atcaagagaa ctgttgctgc tccatccgtt      360
ttcattttcc caccatccga cgaacaattg aagctctgta ctgcttcctg tgtttgtttg      420
ttgaacaact tctacccaag agaggctaag gttcagtgga aggttgacaa cgctttgcaa      480
tccggtaact cccaagaatc cgttactgag caagactcta aggactccac ttactccttg      540
tcctccactt tgactttgtc caaggctgat tacgagaagc acaagggtta cgcttggtgag      600
gttacacatc aggggtttgt cccccagtt actaagtcct tcaacagagg agagtcc      657

```

<210> 14

<211> 657

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> синтетическая конструкция

```

<400> 14
gaggttcagt tgggtgaatc tgggtggtgga ttggttaagc ctggtggttc tttgagattg      60

tctgtgctg cttccggtta cactttctcc agatactcca tgtcctgggt tagacaagct      120

ccaggaagg gattggagtg ggttggtcaa atcaacatca gaggttgtaa cacttactac      180

ccagacactg ttaaggaag attcactatc tccagagatg actccaagaa cactttgtac      240

ttgcagatga actccttgaa aactgaggac actgctgttt actactgtac tactggtgac      300

ttttggggac agggaacttt ggttactgtt tctccgctt ctactaagg accatccgtt      360

tttccattgg ctccatctc taagtctact tccggtggtta ctgctgcttt gggatgtttg      420

gttaaggact acttcccaga gccagttact gtttcttggg actccggtgc tttgacttct      480

ggtgttcaca ctttcccagc tgttttgcaa tcttccggtt tgtactcctt gtcctccgtt      540

gttactgttc cctcctcttc cttgggtact cagacttaca tctgtaacgt taaccacaag      600

ccatccaaca ctaagggtga caagaagggt gaaccaaagt cctctgacaa gactcac      657

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула, включающая Fab-фрагмент антитела, которая специфически связывает пептид Аβ человека между аминокислотными положениями 13 и 28, где указанный Fab-фрагмент антитела содержит варируемую область легкой цепи SEQ ID NO: 1 и варируемую область тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, где указанный Fab-фрагмент антитела ковалентно присоединен к молекуле полиэтиленгликоля (ПЭГ) в положении 56 SEQ ID NO: 2.

2. Молекула по п.1, где молекула ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 0,5 до примерно 30 кДа.

3. Молекула по п.1, где молекула ПЭГ имеет молекулярную массу примерно 20 кДа.

4. Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения состояний, при которых присутствие пептида Аβ вызывает нежелательные патологические эффекты либо вносит вклад в их развитие или снижение активности пептида Аβ оказывает терапевтическое полезное действие, включающая эффективное количество молекулы по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемые растворитель, носитель и/или эксципиенты.

5. Применение молекулы по любому из пп.1-3 в получении лекарственного средства для лечения или предотвращения состояния, связанного с активностью пептида Аβ.

6. Применение молекулы по любому из пп.1-3 в получении лекарственного средства для лечения или предотвращения состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, церебральной амилоидной ангиопатии (ЦАА), когнитивного расстройства, инсульта, кровоизлияния в мозг и общего снижения интеллектуальных способностей.

7. Применение по п.6, где болезнь Альцгеймера является доклинической болезнью Альцгеймера.

8. Применение по п.6, где болезнь Альцгеймера является клинической болезнью Альцгеймера.

