

Область техники

Это изобретение относится к медицине. Точнее это изобретение рассматривает композицию, включающую анти-Аβ антитела без Аβ-пептида или с допустимо низким содержанием его.

Суть изобретения

Главный компонент амилоидных бляшек - это Аβ-пептид аминокислоты со значениями от 39 до 49. Этот пептид получают протеолизом из белка сплошной оболочки типа 1, белка предшественника амилоида (БПА). Образования, выделяемые в среды культивирования клеток, представляют собой преимущественно Аβ-пептиды (1-39/40 или X-39/40), в то время как более длинные образования, Аβ-пептиды (1-42/43 или X-42/43), которые менее растворимы и более склонны к агрегированию, составляют ядрообразующие кристаллы для образования амилоидного отложения. Амилоидные отложения, включающие Аβ-пептид (1-42/43) связывают с такими состояниями и заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, болезнь Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия, сосудистые деменции, легкое когнитивное расстройство и т.п.

Разные терапевтические методы лечения состояний и болезней, связанных с аномальными отложениями, содержащими Аβ-пептид, сосредоточены на предотвращении выделения Аβ-пептида и/или его скопления в бляшки, а также на уменьшении и устранении амилоидных бляшек. Другой подход к лечению предусматривает стимулирование иммуногенной реакции на Аβ-пептид путем введения пептида, например, при активной иммунизации (WO 99/27994). Однако недавние исследования фазы 2А, с использованием подхода активной иммунизации, в случае с человеческим синтетическим Аβ 1-42 пептидом, были приостановлены, поскольку четыре пациента почувствовали клинические симптомы возбуждения центральной нервной системы (ЦНС). С момента прекращения исследования еще у 11-ти пациентов появились симптомы, связанные с возбуждением ЦНС. (Orgogozo et al., *Neurology*, 61:46-54 (2003); Schenk et al., *Curr. Opin. Immun.*, 16:599-606 (2004)).

Назначение Аβ пептида для лечения болезни Альцгеймера вызвало отрицательную реакцию организма и поставило вопрос о безопасности пациента.

Альтернативный иммунологический способ воздействия Аβ-пептида - это назначение антител, специфичных для пептида, например, путем пассивной иммунизации.

Поскольку пассивная иммунизация не устанавливает память в Т- и В-клетках так, как в случае с активной иммунизацией, первая не вызвала такой озабоченности вопросами безопасности, как вторая.

Ранее было показано, что разные линии клеток, такие как K562, M17, НЕК293, CHO и HUVEC, образуют Аβ пептид (Shoji et al., *Science*, 258:126-129 (1992); Haass et al., *Nature* 359:322-325 (1992)). Соответственно, много клеточных линий, которые могут быть использованы для выявления человеческих и гуманизированных антител для клинического применения, такие как CHO и НЕК293, эндогенно содержат БПА голопротеин, а также γ- и β-секретазы, необходимые для расщепления БПА, и, таким образом, естественно экспрессируют Аβ-пептид.

Неожиданно то, что во время получения анти-Аβ антител, было найдено, что Аβ пептид, эндогенно образуемый в большинстве линий клеток млекопитающих, обычно экспрессирующих рекомбинантные антитела, связываются с экспрессируемым анти-Аβ антителом на низких уровнях и это имеет место при культивировании клеток и при их очистке. Наряду с загрязнением пептидом, образующегося рекомбинантного анти-Аβ антитела Аβ-пептидом, имеется вероятность повышенного иммуногенного реагирования у пациента, когда предупреждение, устранение или уменьшение Аβ-пептида имеют ключевое значение. Более того, когда эндогенно образованный Аβ-пептид - нечеловеческого происхождения, как в линии клеток CHO, иммуногенные последствия для нечеловеческого Аβ-пептида, связанного с экспрессируемым анти-Аβ антителом, могут вызвать еще большую обеспокоенность безопасностью человека и, таким образом, сделать предупреждение, устранение или уменьшение Аβ-пептида жизненно важным.

Описание изобретения

Настоящее изобретение представляет композицию, подходящую для назначения человеку, включающую анти-Аβ антитело без Аβ-пептида или с допустимо низким содержанием его.

Также, это изобретение представляет подходящую для назначения человеку композицию, включающую анти-Аβ антитело без нечеловеческого Аβ-пептида или с допустимо низким содержанием его.

Изобретение к тому же представляет композицию, пригодную для назначения человеку, включающую анти-Аβ антитело, в котором содержится невыявленное количество Аβ-пептида.

Это изобретение так же обеспечивает способ получения анти-Аβ антитела, в котором отсутствует Аβ-пептид или которое содержит его в допустимо малых количествах.

Один вариант воплощения изобретения предусматривает экспрессию антитела в клетках NSO. Другой его вариант обеспечивает экспрессию антитела в клетках, в которых образование Аβ предотвращается путем устранения специфического гена, такого как те, которые кодируют БПА, β-секретазу или один из генов γ-секретазы или путем повышенной экспрессии α-секретазы. Следующий вариант воплощения изобретения обеспечивает образование антитела в клеточной культуре, которая содержит ингибитор β- или γ-секретазы. Еще один вариант воплощения изобретения обеспечивает очистку антитела от Аβ-

пептида посредством подкисления и эксклюзионной хроматографии. К тому же, это изобретение представляет способ лечения пациентов с такими состояниями и заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, болезнь Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия, сосудистые деменции, легкое когнитивное расстройство и т.п., с применением композиции настоящего изобретения.

Детальное описание изобретения

В соответствии с целями настоящего изобретения, раскрытыми и заявленными здесь, следующие термины имеют нижеследующие определения.

Под "антителом" подразумевается целое антитело, включая, без ограничения, химерное, гуманизированное, человеческое, рекомбинантное, трансгеническое, привитое антитело и антитела с одной целью, и тому подобное, или любые слитые белки, конъюматы, фрагменты или их производные, которые содержат одну или более областей, избирательно связывающих Аβ пептид. Антитело при этом включает целую молекулу иммуноглобулина, моноклонное антитело, антитело-химеру, гуманизированное антитело, человеческое антитело или иммунологически эффективный фрагмент любого из них. Фрагмент антитела подразумевает фрагменты Fv, Fv, связанный с дисульфидными мостиками, sc Fv, Fab, Fab' или F(ab')₂, которые хорошо известны в уровне техники. Выражение "анти-Аβ антитело" обозначает антитело, которое распознает или связывает Аβ-пептид.

Термин "гуманизированное антитело" означает антитело, состоящее частично или полностью из последовательностей аминокислоты, выделенной из родительской линии антител человека или реаранжированной последовательности, и созданное путем изменения последовательности антитела, имеющего нечеловеческие комплемент-определяющие участки (CDR). Каркасные участки переменных областей заменяются соответствующими человеческими каркасными участками, оставляя области нечеловеческого происхождения (CDR) в основном интактными. Человеческие каркасные участки включают каркасные геномные области, а так же охватывают те, которые содержат одну или более аминокислотных замен. В частности, такие замены включают мутации, в которых аминокислота в определенном местоположении каркаса человека замещается аминокислотой из соответствующего природного положения нечеловеческой CDR. Антитело по отношению к гуманизированному антителу не ограничивается антителом полной длины и может включать фрагменты и образования, состоящие из одной цепи.

Термин "Аβ-пептид" или "Аβ" в этом контексте включает 39, 40, 41, 42 и 43 аминокислотные пептиды, полученные из белка-предшественника амилоида (БПА) *in vivo* путем протеолиза, и любые фрагменты этих пептидов, таких как укороченные с N конца, полученные из этих пептидов (напр. обозначенных x-42, где x=1, 2, 3 и т.д.), укороченные с конца C пептиды, полученные из 1-39, 40, 41 и 42 пептидов, и пептиды, укороченные с обоих концов. См. SEQ ID NO: 1, человеческий Аβ -пептид и SEQ ID NO: 2, Аβ-пептид грызунов (например, мышей, хомяков) для деталей каждой аминокислотной последовательности пептида полной длины.

Используемый здесь термин "β-секретазы" относится к ферменту, участвующему в процессинге БПА, расщепляющего БПА, создавая аминоконец Аβ пептида. Термин "γ-секретазы" относится к ферментному комплексу, участвующему в процессинге БПА, который расщепляет БПА вслед за "β -секретазой", создавая карбоксильный конец Аβ. Термин "α-секретазы" относится к ферменту, участвующему в процессинге БПА, который расщепляет БПА в пределах Аβ-последовательности (между остатками Аβ пептида 16 и 17) на пути к получению растворимого БПА, когда Аβ пептид не продуцируется. Под ингибиторами β- или γ-секретазы подразумеваются молекулы, ингибирующие (блокирующие или снижающие) ферментативную активность β- или γ-секретазы.

Под "допустимо низкими уровнями содержания Аβ-пептида" подразумевается уровень загрязнения Аβ-пептидом в способе получения анти-Аβ антитела, которое может считаться безопасным и при этом приемлемым и пригодным для назначения человеку, особенно в фармацевтической композиции. В частности, допустимо низкие уровни содержания Аβ-пептида были бы такими, которые бы не вызвали иммуногенную реакцию и/или повышенную иммуногенную реакцию у пациента, которому назначили анти-Аβ антитело. Допустимо низкие уровни определялись бы лицом, компетентным в этом вопросе, после работ, которые принято проводить при разработке фармацевтических композиций и препаратов с учетом безопасности.

Под "неуловимой концентрацией" Аβ пептида подразумевается концентрация Аβ-пептида, выходящая за пределы обнаружения методами, обычно применяемыми для измерения концентрации Аβ-пептида при получении анти-Аβ антитела. Эти методы включают, не ограничиваясь ими, ELISA, кислотно-мочевинный гель/вестерн блоттинг анализ (описаны в примерах 1-3), методы масс-спектрометрии, аналитические хроматографические методы или другие чувствительные аналитические методы. Например, кислотный гель/вестерн-анализ, описанный в примерах 1-3, имеет максимальную чувствительность ≈1 пг Аβ/мкг IgA, в то время как ELISA, использованный в примере 3, имеет предел распознавания 0,002 нг/мл. Концентрации Аβ, выходящие за пределы распознавания этими соответствующими методами, были бы неуловимыми.

Композиции настоящего изобретения могут быть получены любым из нескольких методов, извест-

ных из уровня техники. Следующие методы приводятся с иллюстративной целью, но не для ограничения изобретения.

В общем, выработка рекомбинантных антител осуществляется с применением приемов, которые могут быть сгруппированы в 3 основных этапа: создание линии клеток, культивирование клеток и очистка. Таким образом, после того, как создана клеточная линия, анти-Аβ антитело настоящего изобретения обычно получают способом, включающим экспрессию антитела в линии клеток и очистку антитела. Изменения, имеющие место на любом из этих этапов, могут повлиять на экспрессию или характеристики создаваемого антитела. Ряд переменных может повлиять на экспрессию антитела на этапе создания линии клеток, включая конструирование векторов, лидирующие последовательности, содержащиеся там, используемые для трансформирования клеточной линии, делая возможным экспрессию антитела, выбор типа клетки, отбор трансфицированных клеток, генную амплификацию и скрининг линии клеток. Экспрессия антитела из отобранной линии клеток предопределяет использование клеточно-культурной среды. Изменения в средах, также как температурные изменения, питательные вещества и жидкий кислород могут повлиять на выражение и качество продукта. Вслед за экспрессией антитела в клеточной культуре, такие методы очищения, как разные хроматографические методы, фильтрация, буферный обмен, могут изменить характер свойств желаемого продукта, а также его чистоту и природу загрязнения. Ввиду этих общих стадий рекомбинантной выработки антител, настоящее изобретение может быть выполнено с использованием специальных методов или при внесении конкретных изменений на каждой из этих стадий.

Способы получения композиций настоящего изобретения предусматривают источники клеточных линий, также как и модифицированные линии клеток. Как было ранее упомянуто, линия клеток влияет на экспрессию антитела. Способы получения композиций настоящего изобретения включают использование линий клеток млекопитающих для экспрессии анти-Аβ антитела. Линия клеток млекопитающего - это предпочтительно линия клеток хомяка, человека или мыши. Предпочтительней, чтобы линия клеток млекопитающего была CHO, HEK293, PER.C6 или NSO. Предпочтительней всего, чтобы линией клеток млекопитающего была CHO или NSO. Использование клеток NSO для рекомбинантного продуцирования анти-Аβ антитела желательно для создания анти-Аβ антитела, имеющего недетектируемую концентрацию Аβ-пептида (см. пример 3).

Линии клеток млекопитающих, у которых нет БПА или одной из секретаз (β- или γ-секретазы), могут быть использованы для экспрессии рекомбинантных антител. Клеточная линия, в которой отсутствуют или имеются сниженные уровни содержания БПА, β- или γ-секретазы может быть получена путем разных операций с линией клеток или модификаций. Клеточные линии, в которых ген (гены), кодирующие БПА, β- или γ-секретазы, отсутствуют, могут быть созданы методами, известными в уровне техники. Альтернативно, модификации линии клеток могут привести этот результат отсутствия гена. Пример полезной модификации клеточной линии предусматривает существенное уменьшение количества Аβ-пептида, экспрессируемого при разрушении транскрипта рибонуклеиновой кислоты (РНК) для нежелательного белка (БПА или β- или γ-секретазы) способом, называемым интерференцией РНК. Чтобы сделать возможной интерференцию РНК, клетки могут быть стабильно транзигентно трансфицированы или инфицированы, последовательностью ДНК для обеспечения опосредованного плазмидой или вирусом экспрессии маленьких шпилечных структур РНК, которые специфически связываются с желаемым транскриптом, иницируя расщепление и деградацию этого транскрипта, согласно методам, известным в уровне техники. (Banan and Puri, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 5:441-50 (2004); Nesterova and Cho-Chung, *Curr. Drug Targets*, 5:683-9 (2004); Medema, *Biochem J.* 380:593-603, (2004)). В качестве альтернативы клеточной культуры млекопитающих трансгенные растения или клеточные культуры растений были использованы для экспрессии белков (Hellwig et al., 2004, *Nature Biotechnology*, 22:1415 (2004)), и могут быть еще одним источником получения антител с отсутствием Аβ. Подобным образом, разные виды дрожжей обычно используются в качестве альтернативы клеточной культуры млекопитающих и они могут быть применимы для экспрессии антител с отсутствием Аβ. Применение этих методов снижает или предотвращает выработку Аβ-пептида.

Способы получения композиций настоящего изобретения также включают модификации клеточной культуры. По предпочтению, эти способы включают внедрение ингибиторов β- или γ-секретазы в клеточную культуру для продуцирования анти-Аβ антитела с допустимо низкими уровнями содержания Аβ пептида. Известны разные ингибиторы β- или γ-секретазы (напр. U.S. Patent No. 6, 486, 350, U.S. Patent No. 6, 627, 739, Dorey et al., *Neurochem.*, 76:173-181(2001); Yue-Ming et al., *Nature*, 405:689-694 (2000)) и они могут быть использованы для этих способов.

Дополнительные способы получения композиций настоящего изобретения увеличивают продукцию БПА в клеточной культуре, при этом уменьшая количество продуцируемого Аβ-пептида.

Продуцирование растворимого БПА может быть увеличено повышением активности α-секретазы в клеточной линии. Линия клеток с повышенной активностью α-секретазы может быть создана методами, известными из уровня техники. Альтернативно, продуцирование растворимого БПА увеличивается при добавлении меди к клеткам CHO (Borchardt et al., *Biochem J.*, 344:431-467 (1999)). Добавление меди так-

же сильно уменьшило уровень содержания Аβ-пептида в родительских клетках CHO-K1 и в клетках CHO-CUR 3, устойчивых к меди.

Способы получения композиций настоящего изобретения также включают разные методики очистки. Эти методы включают захват белком А (Protein A) антитела из клеточной культуры. Последующая очистка может предусматривать использование агентов для диссоциации анти-Аβ антитела от Аβ-пептида, после чего следует отделение антитела от антигена на основании хроматографических различий между этими двумя образованиями. Диссоциирующие агенты, которым отдается предпочтение, включают кислоту, мочевины, тиоцианат и детергент. После завершения диссоциации антитела и антигена для отделения диссоциированного анти-Аβ антитела от Аβ-пептида используются хроматографические методы, для отделения антигена от антитела или из комплекса антитело-антиген. Хроматографические методы - это предпочтительно эксклюзионная хроматография, хроматография ионообмена, хроматография с обращенной фазой и хроматография гидрофобного взаимодействия. Альтернативно, применяется фильтрация с тангенциальным потоком как еще один метод отделения антигена от антитела. В методе, которому отдано предпочтение, композиции настоящего изобретения, очищаются стадиями, включающими захват белка А, нейтрализацию, разбавление, подкисление антитела, эксклюзионную хроматографию и нейтрализацию (см. пример 2).

Еще один хроматографический метод использует иммобилизованное антитело к другому эпитопу Аβ-пептида или антител, с большей аффинностью к пептиду, для выделения и удаления комплекса, состоящего из антитела и антигена, или антигена.

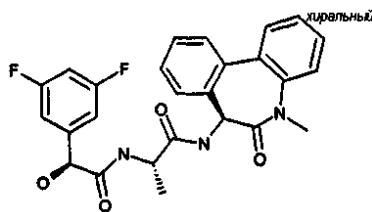
Композиции настоящего изобретения могут применяться для лечения пациентов с такими состояниями и заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, болезнь Дауна, церебральная амилоидная ангиопатия, сосудистые деменции, легкое когнитивное расстройство и т.п. Аβ-пептид может повысить потенциальный иммуногенный риск у пациента в отношении его здоровья, чем в случае с Аβ-пептидом нечеловеческого происхождения. По сути, предупреждение, устранение и уменьшение Аβ-пептида имеет ключевое значение.

Композиции настоящего изобретения пригодны для назначения пациенту в виде фармацевтической композиции, композиции, в которую включены анти-Аβ антитела и фармацевтически приемлемый эксципиент. Примеры приемлемых эксципиентов включают буферы, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизаторы, изотонические агенты, стабилизаторы и т.п., которые используются соответственно выбранному способу введения Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, последнее издание, включено сюда в виде ссылки и служит справочным материалом по вопросам фармацевтики приготовления, с которыми обычно знакомы работники этой области.

Следующие примеры приведены с целью продемонстрировать изобретение, но не для ограничения его.

Пример № 1.

Экспрессия анти-Аβ пептида в клеточной культуре, содержащей ингибитор γ-секретазы.



Ингибитор γ-секретазы (WO 98/28268) добавляется в клеточную культуру НЕК-293, в которой анти-Аβ антитело экспрессируется, уменьшая количество Аβ-пептида, обычно выраженного клетками. Образцы клеточной культуры для этого примера включают контрольную культуру без добавления ингибитора, культуру в которой 1 нМ ингибитор добавляется в момент времени, равного нулю и каждые 24 ч на протяжении пяти дней после этого (5 дневная трансфекция) и культуру в которой 1нМ ингибитор добавляется в момент времени, равного нулю. Эти образцы подвергаются очистке с использованием колонки белка А, а так же эксклюзионной хроматографии. В этих образцах анализируется содержание Аβ-пептида путем разделения кислотнo-мочевинным гелем с последующим вестерн-блотинг анализом, приведенным ниже. Результаты продуцирования и анализа анти-Аβ представлены ниже в табл. 1.

В следующей записи проведения работ описывается метод денатурации образцов муравьиной кислотой с последующим электрофорезом в полиакриламидной матрице кислота-мочевина.

День 1. Установка аппарата.

1) Вычистите и соберите пластинки для разлива акриламидного геля. Например, соберите пластины Хеффера в разливочном стенде (16 см×14 см пластинки с 15 мм прокладками (спейсерами)).

Вычистите тщательно пластины детергентом, ополосните в дистиллированной воде H₂O (дист. H₂O), ополосните в ацетоне и в конце ополосните в 100% EtOH.

2) Сделайте отметки на пластинах на уровне 10 см (22% разделяющий гель) и 11,75 см (10% отде-

ляющий гель).

Приготовление геля и его концентрации

1) Акриламид (40% раствор, подобный заранее заготовленному Bio-Rat/cat # 161-0148)

2) Компоненты геля:

	4% приемный раствор	10%	22%
Мочевина	5,76 г	2,88 г	11,56 г
40% акриламида	1,6 мл	2 мл	17,6 мл
GAA	1,6 мл	800 мкл	3,2 мл
TEMED (2,5 %)	450 мкл	200 мкл	600 мкл
APS (10%)	100 мкл	100 мкл	100 мкл
дист. H ₂ O	до 16 мл	До 8 мл	до 32 мл

Добавьте мочевину, акриламид, ледяную уксусную кислоту (GAA) и дист. H₂O в 50 мл конические пробирки. Взбалтайте немного и поместите водяную баню при 55°C. Взбалтывайте через каждые несколько минут пока мочевина полностью не растворится в растворе. Дегазируйте 22% и 10% растворы и поставьте растворы на лед, оставляя 4% приемный раствор в водяной бане при 55°C. Наливание геля (при комнатной температуре).

1) Добавьте N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) в 22% раствор, слегка переверните несколько раз, чтобы перемешать. Далее переместите 10% персульфата и переверните несколько раз. Используя 25 мл пипетку, медленно наливайте раствор между пластинами, пока он не достигнет отметки 10 см.

2) Осторожно добавьте сверху 750 мкл 5% ледяной уксусной кислоты. Возьмите пипетку P1000 и пропустите 5% уксусную кислоту по одной стороне стеклянных пластинок с попаданием на разделяющий гель (22%).

3) Оставьте для полимеризации при комнатной температуре по крайней мере на час.

4) Добавьте TEMED и APS (10%) в акриламидовый раствор (10%) подобным способом, как и в случае с 22%. Удалите верхний слой и добавляйте раствор, пока он не дойдет до второй отметки 11,75 см. Снова осторожно налейте 750 мкл верхнего слоя GAA (5%), как выше описано. Оставьте для полимеризации на 30 мин.

5) Перед добавлением 4% приемного раствора поставьте гелевый раствор в инкубатор при температуре 37°C на 15 мин для подогрева гелей. Это служит для правильной полимеризации ячеек. Дегазируйте приемный раствор (4%) и держите его при 55°C. Удалите верхний слой. Добавьте TEMED, переверните несколько раз, а затем добавьте APS (10%). Быстро налейте этот раствор и вставьте вычищенную и высушенную 12-ячеечную сотовую сборку (или 15-ячеечную). После наливания концентрирующего раствора, поставьте обратно стенд в инкубатор на 15 мин, а затем удалите его. Оставьте для полимеризации на столе. Полная полимеризация концентрирующего раствора займет по крайней мере полтора часа.

*Примечание: На разных этапах полимеризации в разделяющем геле могут появиться воздушные карманы. Эти карманы образуются из-за изменения температуры геля во время полимеризации и после нее. Эти пространства не влияют на эффективность данного метода.

Пример приготовления образца

Анализ более 3 мг белка, в одной полосе, даст результат с образованием разрешимой полосы. Условия анализа белка следующие:

Образец:

30 мкл от 100 мг/мл белка (максимальное содержание белка),

80 мкл муравьиной кислоты (98%) (ICN cat #15162-90),

20 мкл загрузочного буферного кислого раствора (80% муравьиной кислоты, 60% сахарозы и 0,02% метилового зеленого). Приготовьте буферный раствор, растворяя 6 г сахарозы в ~8мл ~99% муравьиной кислоты. Нагрейте и встряхните смесь. После растворения сахарозы объем раствора доводится до 10 мл с помощью ~99% муравьиной кислоты. Добавьте 2 мкл 1% раствора метилового зеленого.

1 мкл β-меркаптоэтанол.

*Примечание: Установите необходимые объемы и проверьте, чтобы конечное содержание муравьиной кислоты постоянно было от 70 до 90%.

Маркеры.

Маркеры молекулярной массы от Pharmacia, молекулярная масса 2512-16949 (cat# 80-1129-83).

Растворите белок в 1 мл PBS. Заморозьте 10 мкл аликвотных проб при -20°C. Дайте оттаять одной аликвоте на каждый необходимый маркер и добавьте 90 мкл муравьиной кислоты (98%), 20 мкл загрузочного кислого буфера и 1 мкл β-меркаптоэтанол.

*Примечание: Не восстанавливайте эти маркеры согласно указаниям производителя (поскольку SDS вызовет размывание маркера).

Образцы BSA.

Имеют место искажения на внешних двух дорожках прогонки геля (в каждой серии опытов). Чтобы способствовать минимизации негативных эффектов, создаваемых этим искажением, загрузите образцы BSA на внешние дорожки по обе стороны геля. Образцы BSA=1 мкл 5% BSA, 9 мкл муравьиной кислоты (98%), 20 мкл загрузочного буферного кислого раствора и 1 мкл β -меркаптоэтанола.

Работа с гелем.

Подготовка.

Соберите аппарат в прохладной комнате. Заполните самое нижнее отделение (3/4 объема) заранее охлажденным буфером для подвижной фазы.

Добавьте необходимое количество буферного раствора в верхнюю емкость. Подключите гелевый анод к катоду при напряжении в 250 В на 30 мин.

*Удалите все возможные воздушные пузырьки на дне геля и удостоверьтесь в том, что буферный раствор не пролился из верхней емкости.

** Буфер подвижной фазы = 250 мл ледяной уксусной кислоты +3750 мл. дист. H_2O .

Вводимые образцы: промойте ячейки буферным раствором перед введением образцов, чтобы удалить избыток мочевины. Введите образцы, маркеры и образцы BSA, расположенные с наружной стороны. Заметьте, что с двумя маркерами работают так, что перед переносом одна дорожка, содержащая маркерный пептид, урезается и окрашивается кумасси синим.

Поэтапное добавление напряжения.

Подключите гелевый анод к катоду источника по следующему режиму:

15 мин - 25 В

15 мин - 50 В

15 мин - 100 В

15 мин - 200 В

~15 ч - 275 В

** Запустите работу с вечера пока окрашенная красителем передняя сторона не будет составлять ~2-2,5 см от дна, что обычно происходит на следующее утро, если гель был на начальной стадии образования поздно после полудня.

День 2.

Условия переноса кислотно-мочевинного геля (проводится при 4°C в холодной комнате).

В ночь перед переносом приготовьте следующий буферный раствор и поставьте на хранение в холодную комнату.

Буферный раствор для переноса

Tris - основание	12,36г
Глицин	57,6г
Метанол	800мл
Дист. H_2O	до 4л

Нейтрализуйте кислотно-мочевинный гель перед переносом. Осторожно уберите гель и положите его в вымытый стеклянный поднос. Добавьте 200 мл буферного раствора для переноса и покачайте осторожно в течение 15 мин. Повторите эту процедуру в сумме 4 раза. Выполните перенос как это предусмотрено нормой (2,5 ч при напряжении в 100 В).

Окрашивание и обесцвечивание по Ponceau-S.

После переноса визуализируйте белки относительно маркеров с помощью окрашивания по Ponceau-S. Нитроцеллюлоза окрашивается 5 мин в 0,1%-процентном растворе Pon-S в уксусной кислоте (5%). После обесцвечивания мембраны дист. H_2O (три очень быстрых промывания) проведите цифровое сканирование мембраны и отметьте маркеры тупым карандашом. Сохраните файл.

*Примечание: Этот маркерный метод используется исключительно в целях сравнения. Этот метод отделяет пептиды согласно их молекулярному весу и заряду. Например, два пептида одного молекулярного веса, но с разными зарядами вероятно будут иметь разную подвижность по своей потенциальной зоне. Из-за всех этих проблем всегда работайте со стандартами A β пептида, по крайней мере на одной ячейке, что сделает возможным точную идентификацию A β пептида.

**Важно: Все полосы стандартного пептидного маркера не перемещаются. Когда окрашенный синим маркер совмещается с нитроцеллюлозой, окрашенной по Ponceau-S, очевидно, что полосы, составляющие 10,7 kDa и 6,2 kDa, не переносятся.

Условия вестерн-блоттинга.

Кипятите оболочку нитроцеллюлозы 5 мин. Продолжайте дальше, соблюдая условия, заданные вестерн-блоттингом.

Этап блокирования. Заблокируйте мембрану в молоке (5%) в 1X Tris-буферном соляном растворе/0,125% Tween 20®(TBS/T) в течение 45 мин при объеме 50 мл.

Первичное антитело.

Используйте выбранное количество анти-A β антител (напр. 3), чтобы связывающие эпитопы вы-

бранных антител связывались с разными областями A β пептида. Убедитесь в том, что выбранные антитела также позволяют в соответствии со стандартом визуализировать по крайней мере 79 пг.

Первичный раствор антитела находится в 0,5% молока TBS/T при разведении выбранных антител в разведении 1:1000 на 20 мл общего объема. Оставьте первичное антитело на ночь на встряхивателе.

День 3.

Промывка мембраны.

Промойте мембраны 3X в BSA(1%) в TBS/T в течение 15 мин.

Вторичное антитело.

Раствор вторичного антитела - 1% молоко TBS/T с разведением 1:6000 антимишного HRP (Catalog #7076 из Cell Signaling) на 50 мл общего объема. Оставьте мембрану во вторичном антителе на 3 ч.

После вторичного антитела промывайте каждую мембрану 3X TBS/T в течение 15 мин.

Развитие реакции.

Положите мембрану в усиливающий хемилюминисценцию (ELC) раствор (Pierce Super Signal West Pico Catalog #34080) на 5 мин перед развитием реакции.

Максимальная чувствительность этой процедуры зависит от реагентов, использованных во время процедуры вестерн-блоттинга. В примере, описанном выше, максимальная чувствительность этого образца ~1 пг/мкг IgG. Для образцов, концентрация IgG (мг/мл) определяется измерением поглощения при 280 нм и делением этого значения на коэффициент поглощения 1,4.

Анализ образцов, созданных согласно этому примеру, дали следующие результаты:

Таблица 1. Анализ очищенного антитела клеток как с ингибитором γ -секретазы так и без него с помощью кислотно-мочевинного геля.

Образцы	FL ¹ (пг/мкг IgG)	T1 ² (пг/мкг IgG)	T2 ³ (пг/мкг IgG)	Total hA β 40 (пг/мкг IgG)
Ингибитор отсутствует	70	38	70	178
Ингибитор присутствует 24 часа в течение 5 дней	4	0	3	7
Ингибитор при T=0	56	27	52	135

¹ Полная длина hA β 40

² Усечение конца N hA β 40, #1

³ Усечение конца N hA β 40, #2

Пример 2. Очищение анти-A β антитела путем кислотной диссоциации антитела и A β пептида.

Анти-A β антитело экспрессируется из клеток НЕК293, выращенных в клеточной культуре. Антитело очищается от культуральной среды в агарозной колонке с белком А и элюируется с 100 ммоль глицинового буферного раствора, pH 3,1. Все фракции, элюированные из белка А, доводятся приблизительно до pH 7,4 путем добавления небольшого объема буферного раствора 1M Tris, pH 8,0. Эта совокупность элюированных фракций потом доводится приблизительно до pH 2 при разведении 1:1 в 1M глицина, pH 2. Через приблизительно 10 мин после помещения в инкубатор при комнатной температуре все подкисленные фракции подвергаются эксклюзионной хроматографии на колонке 26/60 Superdex 200 (Amersham) с использованием подвижной фазы глицина (50 mM), NaCl (150 mM), pH 2 при скорости потока 30 см/ч. Антитело, элюированное из эксклюзионной колонки, нейтрализуется путем добавления буферного раствора Tris и диализируется против PBS при pH 7,4.

Анализ в полиакриламидном геле с кислотно-мочевинным градиентом в денатурирующих условиях (см. пример 1 для дальнейшего описания этой методики) дают массовые оценки количества A β -пептида в единицах пг на мг, IgG для образцов, полученных очисткой по методу кислотной диссоциации.

После очистки анти-A β антител с применением метода кислотной диссоциации, были получены следующие результаты.

Таблица 2. Анализ очищенного антитела из клеток НЕК293 кислотно-мочевинным гелем: с помощью только эксклюзионной хроматографии (без подкисления) или подкисления и эксклюзионной хроматографии

Образец	FL ¹ (пг/мкг IgG)	T1 ² (пг/мкг IgG)	T2 ³ (пг/мкг IgG)	Общая hA β 40 (пг/мкг IgG)
НЕК 293, без подкисления с помощью хроматографии	39	0	0	39
НЕК 293, с подкисление с помощью хроматографии	11	0	0	11

¹полная длина hA β 40

²Усечение конца N hA β 40, #1

³Усечение конца N hA β 40, #2

Пример 3. Экспрессия анти-A β антитела в клетках NSO.

Анти-A β антитело экспрессируется из клеток NSO, растущих в клеточной культуре. Антитело очищается путем нанесения культуральной среды на агарозную колонку, заполненную белком А и элюируется 100 мМ глициновым буферным раствором, pH 3,1.

Все фракции, элюированные из белка А, доводятся почти до pH 7,4 добавлением 1М буферного раствора - Tris, pH 8,0. Все элюированные фракции затем разводятся в соотношении 1:1 PBS и подвергаются эксклюзионной хроматографии, на колонке 26/60 Superdex 200, используя подвижную фазу PBS, 150 мМ NaCl, pH 7,4 при скорости 30 см/ч.

Антитело, элюированное из эксклюзионной колонки, диализируется против PBS при pH 7,4. При применении анализа в полиакриамидном гелем с кислотнo-мочевинным градиентом в денатурирующих условиях A β -пептид не был обнаружен в анти-A β антителах, полученных по этому способу.

ELISA анализ применяется для определения содержания A β -пептида. Ячейки 96-ячеечной планшеты для ELISA (Nunc Maxisorp™ F96 или C 96) покрыты анти-A β антителами (напр. 2 или более), которые распознают эпитопы с наружной стороны центральной связывающей области A β -пептида (напр. 17-25), при содержании равном, например, 7,5 мкг/мл каждого антитела, в покрывающем буферном растворе в течение ночи, в условиях искусственного охлаждения. После аспирации покрывающего раствора с планшет, ячейки блокируются 30 мкл/ячейка HBST/Blotto (0,25% масса/объем, обезжиренного сухого молока в забуференном физрастворе с HEPES (10 мМ и 150 мМ соответственно), с EDTA (3 мМ) и Tween20® (0,5% мас./объем) на 1 или 2 ч при комнатной температуре, а потом промываются промывающим буферным раствором (1X PBS с 0,1% объем/объем Tween20®) и аспирируются. Образцы, содержащие антитело, соответственно разбавляются в HBST/Blotto и наносятся в планшеты для ELISA (100 мкл на ячейку). Эквивалентные разведения маркируются дополнительным синтетическим A β -пептидом грызуна 0,4 нг/мл, чтобы убедиться в точном вычислении матрицы разведений образцов. В соответствии со стандартом используется синтетический A β -пептид грызуна 1-40 наряду с очищенным анти-A β антителом (<1 ppm (млн⁻¹) общего A β -пептида грызуна). Контрольные образцы, содержащие антитела для общего контроля A β -пептида) и синтетический A β -пептид грызуна 1-42, добавленный, как маркер антитела (для A β -пептид 1-42 контроля) также тестируются. Планшета для ELISA помещается в инкубатор на 1-2 часа при комнатной температуре. Ячейки промывают буферным промывающим раствором 4X и аспирируют. Затем конъюгат античеловеческого IgG (100 мкл/ячейка) в разведении 1:10000 с щелочной фосфатазой (Jackson ImmunoResearch, # 709-056-149) в HBST/Blotto наносится в каждую ячейку. После инкубирования в течение 1-2 ч при комнатной температуре, планшеты промывают буферным промывающим раствором 4X и аспирировав ячейки, добавляют раствор субстрата pNPP (100 мкл от 1,0 мг/мл) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, #50-80-00) в буферном растворе (1xDEA) в каждую ячейку. Планшеты для ELISA помещают в инкубатор при комнатной температуре при периодическом встряхивании.

Поглощение регистрируется при 405 нм с использованием микроспектрофотометра, когда достаточно проявляется цвет (обычно 2,0-2,5 абсорбирующих единиц) по стандартам. Предел обнаружения - 0,02 нг/мл. Предел квантования - 0,1 нг/мл. Определение уровней содержания по стандартам проводится анализом AAA. В случае с образцами определение уровня содержания IgG (мг/мл) проводится путем измерения поглощения при 280 нм и деления это значения на коэффициент поглощения. При применении ELISA для анти-A β антител выраженным в клетках NSO, как описано выше, A β -пептида не было обнаружено.

Пример 4. Снижение содержания A β -пептида путем катионного обмена при получении гуманизированного анти-A β .

Препарат гуманизированного анти-A β антитела экспрессируется в клетках CHO. Антитело очищается нанесением культуральной среды на колонку А агарозы с белком А и элюируется 100 мМ глициновым буферным раствором, pH 3,1. Все фракции элюированных из белка А доводятся примерно до pH 7,4 добавлением 1М Tris - буферного раствора pH 8,0. Приготовленное антитело содержит 15 ч·млн⁻¹ A β -пептида хомяка, как установлено при помощи ELISA.

В дальнейшем антитело очищается с помощью хроматографии катионного обмена следующим образом.

Первичный материал антитела диализируют против 50 мМ ацетата натрия при pH 5,2 (5 объемов, при использовании с ультрафильтра PES отсечкой в 30 кДа в тангенциальном потоке) для уменьшения проводимости препарата для нанесения на колонку для катионного обмена. Раствор диафильтрованного белка наносится на колонку высокого разрешения, заполненную сефарозой (GE Healthcare), (0,66x15 см, загруженную в соотношении 15 мг белка/1мл объема колонки), уравновешенной 50 мМ ацетата натрия при pH 5,2. Все манипуляции проводятся при комнатной температуре и скорости потока 115 см/ч. После загрузки колонка промывается 5-колоночными объемами 50 мМ ацетата натрия при pH 5,2, и антитело

элюируется или поэтапно (5 колонных объемов 50 мМ ацетата натрия, 135 мМ NaCl, pH 5,2) или с помощью градиента объемом 15-колонок от 0 до 150 мМ NaCl в 50 мМ ацетате натрия, pH 5,2. Фракции главного пика объединяются (для достижения выходного продукта приблизительно 90%). В результате очистки анти-Аβ-антитела таким способом содержание Аβ-пептида в объединенной пробе снизилось по сравнению с первичным материалом (одностадийно-элюированный материал-10 ч·млн⁻¹, градиентно-элюированный материал-9 ч·млн⁻¹).

Пример 5. Снижение содержания Аβ в анти-Аβ антителах путем иммуноочистки.

Анти-Аβ антитело, которое связывается в центральной области человеческого Аβ между аминокислотами 13-28 экспрессируется из клеток НЕК-293, выращенных в клеточной культуре. Загрязняющий человеческий Аβ-пептид отделяется от антитела путем иммуноочистки с использованием моноклонального антитела, направленного против карбоксильного конца Abeta40, 2G3, связанного с агарозными шариками. Препарат антитела вращается всю ночь при соотношении объема шариков, связанных с 2G3 равном 10:1. После инкубирования в течение ночи агарозные шарики способны удалять 2G3-Аβ - комплексы. Затем применяется ELISA для определения количества Аβ-пептида, присутствующего в анти-Аβ антителе до и после иммуноочистки.

Было обнаружено, что приготовление таким способом иммуноочистки анти-Аβ антитела и проанализированные при помощи ELISA содержат 10-25 пг Аβ/мкг IgG до очистки и не содержат какое-либо детектируемое количество Аβ после очистки. Уменьшение загрязнения Аβ было подтверждено кислотнo-гелевым анализом и анализом вестерн-блоттинг, описанными в примере 1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, пригодная для введения человеку, отличающаяся тем, что содержит очищенное анти-Аβ, где антитело экспрессируется в линии клеток, которые эндогенно продуцируют Аβ-пептид, и где антитело выделено очисткой из клеточной линии, имеет недетектируемую концентрацию или имеет допустимо низкие уровни эндогенно продуцируемого Аβ-пептида.

2. Способ получения анти-Аβ антитела, отличающийся тем, что включает в себя стадии:

- а) экспрессии анти-Аβ антитела в клетках, которые эндогенно экспрессируют Аβ-пептид;
- б) добавления ингибитора β- или γ-секретазы к среде, используемой для роста клеток; и
- с) выделения очисткой антитела из среды роста, где очищенное антитело имеет недетектируемую концентрацию или имеет допустимо низкие уровни эндогенно продуцируемого Аβ-пептида.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что к среде добавляют ингибитор γ-секретазы.

4. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки млекопитающего.

5. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки хомячка, человека или мыши.

6. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что клетки выбраны из группы, состоящей из клеток CHO, HEK 293, PER.C6 и NSO.

7. Способ получения анти-Аβ антитела, отличающийся тем, что включает в себя стадии:

- а) экспрессии анти-Аβ антитела в клетках, которые эндогенно продуцируют Аβ-пептид и α-секретазу;
- б) повышения активности α-секретазы в указанных клетках;
- с) выделения очисткой антитела из среды, используемой для роста клеток, где очищенное антитело имеет недетектируемую концентрацию или имеет допустимо низкие уровни эндогенно продуцируемого Аβ-пептида.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Eli Lilly and Company

<120> АНТИ-А β АНТИТЕЛА

<130> X16324

<150> US 60/546,764

<151> 2004-02-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

35 40

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> Hamster sp.

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

35 40



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6