



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103602** (13) **C2**
(51) МПК**C07K 16/18** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2010 06547	(73) Власник(и):	ЕНСЕРМ (ЕНСТІТЮ НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ Е ДЕ ЛЯ РЕШЕР МЕДІКАЛЄ), 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13, France (FR), САНОФІ-АВЕНТИС, 174, avenue de France, F-75013 Paris, France (FR)
(22) Дата подання заявки:	24.10.2008	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.11.2013	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO2004013172 A2, 12.02.2004. "Antibodies to Beta Amyloid Proteins" INTERNET CITATION, [Online] 3 June 2002 (2002-06-03), XP002257888 Retrieved from the Internet: URL: http://web.archive.org/web/20020623071147/www.alzforum.org/members/research/antibodies/Beta-Amyloid/page_set.html [retrieved on 2003-10-15]. MURAYAMA ET AL: "A novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated beta-amyloid Abeta5-40/42 produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein" JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 161, no. 2, 27 March 2007 (2007-03-27), pages 244-249. SERGEANT N ET AL: "Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, NEW YORK, NY, US, vol. 85, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 1581-1591.
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	07119537.4		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	29.10.2007		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	EP		
(41) Публікація відомостей про заяву:	25.08.2010, Бюл.№ 16		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.11.2013, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2008/064432, 24.10.2008		
(72) Винахідник(и): Ванмешелен Ежен (BE), Гроньє П'єр (BE), Сержан Ніколя (FR), Гомпель Марі (FR), Делакурт Андре (FR), Бює Люк (FR), Прадьє Лоран (FR), Бланшар-Брежон Веронік (FR)			

(54) АНТИТІЛО, СПЕЦИФІЧНЕ ДО β -АМІЛОЇДНИХ ПЕПТИДІВ, І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЯК ДІАГНОСТИЧНОГО АБО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**(57)** Реферат:

UA 103602 C2

Винахід належить до моноклонального антитіла TeiA 1.6, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, де x складає від 11 до 42, і не впізнає ні $A\beta_{1-40}$ ні $A\beta_{1-42}$, і яке має високу специфічність до пептиду $A\beta_{8-x}$, що визначається утворенням імунологічного комплексу між моноклональним антитілом і пептидом $A\beta_{8-x}$.

Даний винахід стосується нових антитіл, специфічних до β -амілоїдних пептидів, і їх застосування як діагностичних або лікарських засобів.

Амілоїдоз є патологічним станом у ссавців, який характеризується присутністю амілоїдних волокон. Амілоїд є загальним терміном, який належить до групи різних, але певних білкових відкладень. Всі амілоїдні відкладення мають загальні морфологічні властивості, забарвлюються певними барвниками (наприклад, конго червоним), і мають характерне червоно-зелене двоякозалошне забарвлення в поляризованому світлі після фарбування. Різні амілоїди також характеризуються типом білка, який присутній у відкладенні. Наприклад, нейродегенеративні захворювання, такі як скрейпи, бичачий губчастий енцефаліт, хвороба Крейтцфельдта-Якоба і т.п., характеризуються появою і накопиченням стійкої до дії протеаз форми пріонного білка (званого AScr або PrP-27) в центральній нервовій системі. Аналогічно, хвороба Альцгеймера, інше нейродегенеративне порушення, характеризується накопиченням нейритних бляшок і нейрофібрилярних клубків. У цьому випадку бляшка і амілоїд кровоносних судин формуються внаслідок відкладення фібрилярного β -амілоїдного білка.

Хвороба Альцгеймера (AD) є найбільш поширеною формою старечої деменції і, як вважають, відповідальна за 40-60 % всіх випадків деменції. Частота виникнення AD збільшується з віком, стосуючись 1 з 10 людей старше за 65 років і майже 1 з 2 людей старше за 85 років. Загалом, перебіг хвороби може бути охарактеризований як безповоротно прогресуюче мозкове порушення, яке, зрештою, призводить до руйнівної втрати пам'яті, глибоких змін поведінки і індивідуальності, а також до важких порушень когнітивних здатностей. Перераховані порушення пов'язані з лежачою в їх основі загибеллю мозкових клітин і порушенням комунікації між ними. У зв'язку з великими витратами систем охорони здоров'я, які повинні забезпечувати стаціонарний і допоміжний догляд за пацієнтами з AD, негативний вплив AD на суспільство і на національні економіки величезний.

Разом з втратою нейронів, при AD в мозку спостерігаються два основні типи гістологічних пошкоджень (Felician and Sandson, (1999), *The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 11: 19-31):

(i) на внутрішньоклітинному рівні, нейронний цитоскелет у пацієнтів з AD прогресивно руйнується і замінюється нейрофібрилярними клубками (NFTs), що складаються з парних спіральних філаментів (PHF);

(ii) на позаклітинному рівні, амілоїдні бляшки формуються при відкладенні фібрилярного β -амілоїду (A β).

A β є основним компонентом старечих бляшок. A β являє собою невеликий пептид, існуючий головним чином в двох типах, що мають різний розмір, які складаються з 40 (A β_{1-40}) і 42 амінокислот (A β_{1-42}), відповідно, а також, в незначних кількостях, у вигляді типів з іншими розмірами. A β , як відомо, утворюється в результаті протеолітичного розщеплення APP (Saido, (2000), *Degradation of amyloid- β peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention and therapy*. Neurosci. News 3: 52-62), великого трансмембранного білка з відомими, хоча і не повністю вивченими, нейротрофічними функціями (Seo et al., (2001), *Effects of nicotine on APP secretion and Abeta-or CT(105)-induced toxicity*. Biol. Psychiatry 49: 240-247). APP може розщеплюватися по двох основних шляхах, головному неамілоїдогенному шляху і мінорному другому амілоїдогенному шляху, який призводить до утворення A β як кінцевого продукту.

Основний шлях катаболізму APP протікає через розщеплення під дією α -секретази за єдиним сайтом в APP, поблизу центра області β -амілоїдного пептиду (Esch et al., (1990), *Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor*. Science 248:1122-1124; Sisodia, (1992), *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6075-6079). Продукти, до яких призводить даний шлях, являють собою велику N-кінцеву область APP (APP_s) і мембранозв'язаний C-кінцевий фрагмент (C83), який згодом гідролізується γ -секретазою з утворенням майже невідомого малого р3 пептиду. Цей шлях є неамілоїдогенним, оскільки сайт розщеплення розташований приблизно в середині послідовності A β , без можливості формування A β . Другий шлях процесинга APP включає N- і C-кінцеве розщеплення APP β - і γ -секретазами (Фіг. 1). Молекули що утворюються в двох вказаних стадіях протеолізу, являють собою центральні фрагменти APP - A β_{40} і A β_{42} , причому A β_{40} є таким, що більш часто зустрічається з усіх утворюваних A β (Conde, (2002), *β -amyloid peptide as a target for treatment of Alzheimer's disease*. Expert Opin. Ther. Patents 12: 503-512. Спочатку β -секретаза розщеплює β -амілоїдний пептид на N-кінці, потім γ -секретаза вирізає C-кінець пептиду. Це твердження засноване на вивченні C-кінцевих фрагментів, що утворюються при розщепленні β -секретазою, які можна легко спостерігати в клітинах, тоді як фрагменти APP, що відповідають одиночному C-кінцевому γ розщепленню - ні (Haass et al., (1992), *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature 359: 322-325; Seubert et al.,

(1992), Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327).

Амілоїдні пептиди, залучені до відкладення паренхіматозних бляшок, відрізняються від відкладення бляшок, що спостерігаються в моделях на трансгенних мишах (Sergeant, N. et al. (2003) Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry* 85: 1581-1591; Kalback, W. et al. (2002) APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry* 41: 922-928; Rufenacht, P. et al. (2005) Quantification of the A β peptide in Alzheimer's plaques by laser dissection microscopy combined with mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 40: 193-201).

Зокрема, N-усічені форми A β_{42} набагато більш часто зустрічаються, ніж повнорозмірний, утворений під дією секретаз, A β . Крім того, в модельних системах і в циркулюючих рідинах, таких як СМР і плазма, була виявлена зростаюча кількість додаткових A β пептидів (Lewczuk, P. et al. (2004), Amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid as profiled with surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: evidence of novel biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*. Mar. 1.; 55, 524-530; Lewczuk, P. et al. (2004), Electrophoretic separation of amyloid beta peptides in plasma. *Electrophoresis*. 25, 3336-3343; Lewczuk, P. et al. (2003), The amyloid-beta (Abeta) peptide pattern in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: evidence of a novel carboxyterminally elongated A β peptide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 17, 1291-1296; Wiltfang, J. et al. (2002), Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated A β peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuro inflammation. *J. Neurochem.* 81, 481-496; Qi-Takahara, Y. et al. (2005), Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445; Funamoto, S. et al. (2004), Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42. *Biochemistry* 43, 13532-13540; Sato, T. et al. (2003), Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 β beta-amyloid precursor protein. *J Biol. Chem.* 278, 24294-24301).

Імунотерапія при хворобі Альцгеймера із застосуванням антитіл, направлених до β -амілоїдного пептиду, є новим потенційним способом лікування хвороби Альцгеймера (Schenk et al., (2000), beta-peptide immunization: a possible new treatment for Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57: 934-936; Hock et al., (2003), Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38: 547-554).

Однак, оскільки β -амілоїд є природним компонентом нормальної тканини і біологічних рідин, важкі побічні ефекти зупинили перші клінічні випробування (Orgogozo et al., (2003), Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta 42 immunization. *Neurology* 61: 46-54).

Sergeant зі співр. показав (Sergeant et al., (2003), Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry* 85: 1581-1591), що 60 % всіх типів A β в ранньому амілоїдних відкладенні є N-усіченими типами A β .

У міжнародній заявці WO 2004/029630 розкрито моноклональне антитіло, яке специфічно впізнає A β_{11-x} пептиди і не впізнає пептид A β_{1-x} (x означає 40 або 42).

Пептиди, що використовуються для імунізації, є першими 5-7 людськими амінокислотами сайту розщеплення β -секретазу₁₁ (β секретаз розщеплює білок APP по Glu 11). Проте, пептиди A β_{11-x} не є A β -пептидами, що спостерігаються на передранніх стадіях відкладення амілоїду (Sergeant et al., Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry* 85, 1581-1591 (2003)). Крім того, A β_{11-x} не є патологічними типами, оскільки вони утворюються в результаті розщеплення β -секретазою, і N-усічені форми A β_{42} набагато більш поширені, ніж повнорозмірні варіанти A β_{42} і A β_{11-x} .

Міжнародна заявка WO 2004/013172 належить до поліклональних антитіл, направлених і усічених варіантів бета-амілоїдного пептиду A β_{m-n} , де m складає від 1 до 10, а n складає від m+3 до m+15. Пептидами, що використовуються для імунізації, є A β_{5-12} , A β_{6-13} , A β_{8-15} , A β_{9-16} . Проте, антитіла в цій заявці є поліклональними і мають помірну афінність.

Murayama K. S. і співр. (Murayama K. S. et al., (2007), A novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated β -amyloid A $\beta_{5-40/42}$ produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein, 161: 244-249) описали моноклональне антитіло, одержане при імунізації пептидом A β_{5-12} , яке специфічно впізнає A β_{5-40} , але не A β_{1-40} .

У цій статті також описані два інші антитіла:

- моноклональне мишаче антитіло 4G8, специфічне до A β_{17-24} ;

- поліклональне кроляче антитіло Ab-1, специфічне до $A\beta_{15-30}$.

Однак два вказані антитіла не є специфічними і впізнають як $A\beta_{5-40}$, так і $A\beta_{1-40}$.

Одна з цілей даного винаходу складається в одержанні антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$ і не впізнає $A\beta_{1-x}$ (x означає 40 або 42), а також здатне

Інша мета даного винаходу полягає в одержанні синтетичних пептидів, які можуть використовуватися для генерації імунної відповіді проти N-усічених пептидів $A\beta$ і, отже, можуть використовуватися для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера.

Даний винахід також належить до способу одержання антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$.

Даний винахід також належить до способу визначення амілоїдних відкладень в організмі у ссавців.

Наступна мета даного винаходу полягає в розробці способу визначення у ссавця сприйнятливості до захворювання, пов'язаного з утворенням і/або накопиченням $A\beta$, такого як хвороба Альцгеймера, визначення у ссавця ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або накопиченням β -амілоїду, такого як хвороба Альцгеймера, скринінгу кліренсу β -амілоїдного відкладення у ссавця або прогнозування рівня β -амілоїдного навантаження у ссавця.

Даний винахід також належить до терапевтичних або вакцинних композицій, що включають антитіло, специфічне до N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$, або що включає синтетичні пептиди з вільною N-кінцевою частиною, що імітує вільну N-кінцеву частину N-усічених $A\beta$ -пептидів, які можуть застосовуватися для приготування лікарського засобу або вакцини, призначеного для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера.

Даний винахід також належить до застосування антитіла в одержанні лікарського засобу або вакцини, призначеного для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера.

Таким чином, даний винахід належить до антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, де x складає від 11 до 42, і не впізнає ні $A\beta_{1-40}$, ні $A\beta_{1-42}$.

Термін "антитіло" використовується для позначення поліклональних або моноклональних антитіл, специфічних до $A\beta_{8-x}$, а також включає фрагменти або молекули, які імітують моноклональні антитіла, специфічні до $A\beta_{8-x}$, і зокрема епітопзв'язуючий фрагмент. Фрагменти або молекули можуть бути одержані з моноклональних антитіл генно-інженерними або ферментативними, або хімічними методами, і можуть мати подібні характеристики зв'язування в порівнянні з моноклональним антитілом для фрагмента антигену.

Під терміном "поліклональне антитіло" розуміється антитіло, одержане з різних ліній В-клітин.

Під терміном "моноклональне антитіло" розуміється антитіло, що походить тільки з одного типу клітин - клітини гібридоми.

Під терміном клітина "гібридоми" розуміється злита клітина, яка безперервно продукує антитіла, тобто пухлинні клітини, які можуть нескінченно реплікуватися і які злиті з клітинами ссавців.

Антитіла згідно з даним винаходом включають як повнорозмірні, антитіла, описані вище, так і їх епітоп-зв'язуючі фрагменти. "Фрагменти антитіла", що використовуються в даній заявці, включають будь-яку частину антитіла, яка зберігає здатність зв'язуватися з епітопом, пізнаванням повнорозмірним антитілом, зазвичай звану "епітоп-зв'язуючими фрагментами". Приклади фрагментів антитіла включають, крім інших, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, одноланцюжкові Fvs (scFv), одноланцюжкові антитіла, дисульфід-зв'язані Fvs (dsFv) і фрагменти, що включають або V_L, або V_H область. Епітоп-зв'язуючі фрагменти, що включають одноланцюжкові антитіла, можуть включати варіабельну область (області), одну або в комбінації з усім або частиною з наступного: шарнірною областю, CH1, CH2 і CH3 доменами.

Такі фрагменти можуть містити один або обидва Fab фрагменти або F(ab')₂ фрагмента. Крім того, вказані фрагменти можуть бути або можуть поєднувати представників будь-якого з наступних класів імуноглобуліну: IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, і їх підкласи.

Fab фрагмент або F(ab')₂ фрагменти можуть бути одержані протеолітичним розщепленням, з використанням таких ферментів, як папаїн (Fab фрагменти) або пепсин (F(ab')₂ фрагменти).

"Одноланцюжкові FVs" ("scFvs") фрагменти являють собою епітоп-зв'язуючі фрагменти, які містять щонайменше один фрагмент з варіабельної області важкого ланцюга антитіла (V_H), зв'язаний щонайменше з одним фрагментом з варіабельної області легкого ланцюга антитіла (V_L). Лінкер може бути коротким, гнучким пептидом, вибраним таким чином, щоб забезпечувати правильне трьохмірне укладання V_L і V_H областей, що зустрічається тоді, коли вони зв'язані таким чином, щоб зберігати цільову специфічність молекули цілого антитіла, з якого походить

фрагмент одноланцюжкового антитіла. Карбоксильний кінець V_L або V_H послідовності може бути ковалентно зв'язаний лінкером з амінокислотним кінцем комплементарної послідовності V_L або V_H .

Фрагменти одноланцюжкового антитіла згідно з даним винаходом містять амінокислотні послідовності, що включають щонайменше одну з варіабельних областей або областей, що визначають комплементарність (CDRs), повнорозмірних антитіл, описаних в даний заявці, але не містять деяких або всіх константних областей вказаних антитіл. Вказані константні області не є необхідними для зв'язування антигену, але становлять основну частину структури цілих антитіл. Фрагменти одноланцюжкового антитіла можуть, отже, подолати деякі з проблем, пов'язаних із застосуванням антитіл, що містять частину або всю константну область. Наприклад, фрагменти одноланцюжкового антитіла практично вільні від небажаних взаємодій між біологічними молекулами і константною областю важкого ланцюга, або від іншої небажаної біологічної активності. Крім того, фрагменти одноланцюжкового антитіла значно менше повнорозмірних антитіл і, отже, можуть мати велику капілярну прохідність, ніж повнорозмірні антитіла, що дозволяє фрагментам одноланцюжкового антитіла локалізуватися і зв'язуватися з цільовими антиген-зв'язуючими сайтами більш ефективно. Крім того, фрагменти антитіла можуть продукуватися на відносно високому рівні в прокаріотичних клітинах, що полегшує їх одержання. Крім того, відносно невеликий розмір фрагментів одноланцюжкового антитіла зменшує імовірність того, що вони викличуть імунну відповідь у реципієнта, в порівнянні з повнорозмірними антитілами.

Фрагменти одноланцюжкового антитіла можуть бути одержані молекулярним клонуванням, з бібліотеки фагового дисплею антитіл, або подібними методами, відомими кваліфікованому фахівцеві. Вказані білки можуть бути одержані, наприклад, в еукаріотичних або прокаріотичних клітинах, включаючи бактерії. Епітоп-зв'язуючі фрагменти згідно з даним винаходом також можуть бути одержані із застосуванням різних способів фагового дисплею, відомих з рівня техніки. У способах фагового дисплею, функціональні області антитіла презентуються на поверхні частинок фага, які несуть полінуклеотидні послідовності, що кодують їх. Зокрема, такий фаг може використовуватися, щоб презентувати епітоп-зв'язуючі домени, експресовані з репертуару або комбінаторної бібліотеки антитіла (наприклад, людини або миші). Фаг, що експресує епітоп-зв'язуючий домен, який зв'язує цільовий антиген, може бути відібраний або ідентифікований за допомогою антигену, наприклад, з використанням міченого антигену, зв'язаного або приєднаного до поверхні твердої частинки або гранули. Фаги, що використовуються у вказаних способах, зазвичай являють собою ниткоподібний фаг, включаючи fd і M13 зв'язуючі домени, що експресуються з фага з Fab, Fv або дисульфід-стабілізованими Fv доменами антитіла, рекомбінантно злитими або з геном III фага, або з геном білка VIII.

Приклади способів фагового дисплею, які можуть використовуватися для одержання епітоп-зв'язуючих фрагментів згідно з даним винаходом, включають способи, розкриті в Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol, 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57: 191-280; WO 1992/001047; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; а також патентах США 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108, які повністю включені в дану заявку шляхом посилання.

Після відбору фага, області фага, що кодує фрагменти, можуть бути виділені і використані для одержання епітоп-зв'язуючих фрагментів шляхом експресії у вибраному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії, з використанням генної інженерії, наприклад, як описано детально нижче. Наприклад, також можуть застосовуватися технології одержання рекомбінантних Fab, Fab' і $F(ab')_2$ фрагментів з використанням способів, відомі з рівня техніки, такі, як розкриті в WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12 (6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34:26-34; а також Better et al., 1988, Science, 240:1041-1043; вказані посилання повністю включені в дану заявку шляхом посилання. Приклади методів, які можуть використовуватися для одержання одноланцюжкових Fvs і антитіл, включають описані в патентах США 4,946,778 і 5,258,498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology, 203:46-88; Shu et al., 1993, PNAS, 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science, 240:1038-1040.

Функціональні еквіваленти антитіл, конкретно описані в даний заявці, також включені в межі даного винаходу. Термін "функціональні еквіваленти" включає антитіла з гомологічними послідовностями, химерні антитіла, штучні антитіла і модифіковані антитіла, наприклад, такі, в яких кожний функціональний еквівалент визначається його здатністю специфічно зв'язуватися з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-х}$, як визначено вище. Фахівець зуміє зрозуміти, що існує збіг в

групі молекул, позначений "фрагменти антитіла", і групі, позначений "функціональні еквіваленти". Способи одержання функціональних еквівалентів відомі фахівцям і розкриті, наприклад, в WO 93/21319, EP239400; WO 89/09622; EP338745 і EP332424, які повністю включені в дану заявку шляхом посилання.

Штучні антитіла включають scFv фрагменти, діатіла, триатіла, тетратіла і mru (див. огляди, Winter, G. and Milstein, C., 1991, *Nature*, 349:293-299; Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, 11:548-557), які мають антигенно-зв'язуючу здатність. В одноклановому Fv фрагменті (scFv), V_H і V_L домени антитіла зв'язані гнучким пептидом. Зазвичай вказаний лінкерний пептид має довжину близько 15 амінокислотних залишків. Якщо лінкер значно коротше, наприклад, має довжину 5 амінокислот, то утворюються діатіла, які є бівалентними scFv димерами. Якщо лінкер укорочений менше ніж до трьох амінокислотних залишків, утворюються тримірні і тетрамерні структури, які називають триатіла і тетратіла. Найменша зв'язуюча одиниця антитіла це CDR, зазвичай CDR2 важкого ланцюга, які мають таку достатню здатність до специфічного впізнавання і зв'язування, що може використовуватися окремо. Такий фрагмент називають молекулярною одиницею впізнавання або mru. Декілька таких mru можуть бути з'єднані разом короткими лінкерними пептидами, формуючи, таким чином, штучний зв'язуючий білок з більш високою авідністю, ніж у одного mru.

Функціональні еквіваленти згідно з даним винаходом також включають модифіковані антитіла, наприклад, антитіла, модифіковані ковалентним приєднанням молекули будь-якого типу до антитіла. Наприклад, модифіковані антитіла включають антитіла, які були модифіковані, наприклад, глікозилюванням, ацилюванням, пегілюванням, фосфорилуванням, амідуюванням, дериватизацією відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичним розщепленням, приєднанням до клітинного ліганду або іншого білка і т.д. Ковалентне приєднання не заважає антитілу індукувати анти-ідіотипічну відповідь. Ці модифікації можуть бути виконані відомими способами, включаючи, крім інших, специфічне хімічне розщеплення, ацилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину і т.д. Крім того, модифіковані антитіла можуть містити одну або більше неklasичних амінокислот.

Функціональні еквіваленти можуть бути одержані шляхом взаємної заміни різних CDRs на різних ланцюгах в різних каркасних областях. Таким чином, наприклад, різні класи антитіла можливі для заданого набору CDRs за допомогою заміни різних важких ланцюгів, внаслідок чого можуть бути одержані, наприклад, типи антитіл і ізотипи IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE. Аналогічно, в межах даного винаходу, шляхом вставки заданого набору CDRs в повністю синтетичну каркасну область, можуть бути одержані штучні антитіла.

Функціональні еквіваленти можуть бути легко одержані мутацією, делецією і/або вставкою в послідовностях варіабельних і/або константних областей, які фланкують специфічний набір CDRs, з використанням широкої різноманітності способів, відомих в рівні техніки.

Антитіло специфічне до вказаної N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$, може бути виявлене за допомогою імуноаналізу. Використовуваний в даний заявці "імуноаналіз" являє собою аналіз, в якому для специфічного зв'язування з антигеном (тобто з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$) використовується антитіло. Імуноаналіз, таким чином, характеризується визначенням специфічного зв'язування білків з антитілами.

Вирази "специфічно зв'язуються з", "специфічне впізнавання", "що специфічно впізнає", "специфічно реагуюче з" або "специфічно створююче імунологічний реакцію з" належить до реакції зв'язування антитіла з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, яка дозволяє визначати присутність N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$ в зразку, що тестується, в присутності гетерологічної популяції інших білків і/або інших біоматеріалів. Специфічність може бути визначена за допомогою аналізу Lumipex. При використанні даного аналізу, антитіла згідно з даним винаходом виявляють високу специфічність до пептиду $A\beta_{8-x}$, тобто середня інтенсивність флуоресценції (MFI), одержана з антитілом, набагато вища з пептидом $A\beta_{8-x}$, ніж з неспецифічним пептидом, таким як $A\beta_{6-13}$ пептид, наприклад, MFI=1822 для TeiA1.1 з пептидом $A\beta_{8-15}$ і тільки 24 з пептидом $A\beta_{6-13}$ (див. приклад 3 і таблицю 3).

Імунологічні методи дослідження включають, крім інших, рідинні реакції або реакції преципітації в гелі, імунодифузії (одинарну або подвійну), аналізи аглютинації, імуноелектрофорез, радіоімуноаналіз (RIA), твердофазні імуоферментні аналізи (ELISA), Вестерн-блот аналізи, ліпосомні імуноаналізи (Monroe et al., 1986), аналізи зв'язування комплементу, імунорадіометричні аналізи, імунофлуоресцентні аналізи, імуноаналізи з протеїном A або імуно-ПЛР. Короткий огляд різних імуноаналізів наведений в Wild D. (2001) (Wild D. (2001), *The Immunoassay Handbook* 2nd edition. Nature Pr., London, UK), а також Ghindilis et al. (2002) (Ghindilis A.L., Pavlov A.R., Atanassov P.B. (eds.) (2002) *Immunoassay Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, US).

Таким чином, в певних умовах імуноаналізу, вказане специфічне антитіло переважно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$ даного винаходу, тоді як зв'язування з іншими білками або ізоформами білка в істотних кількостях не відбувається.

Зокрема, вказане специфічне антитіло не зв'язується з пептидом $A\beta_{1-42}$ і, отже, не буде викликати важких побічних ефектів, що спостерігаються з антитілами проти пептиду $A\beta_{1-42}$, у випадку застосування в терапевтичних цілях (див. приклад 5).

Така відповідь може бути активною відповіддю, індукованою введенням імуногена, або пасивною відповіддю, індукованим введенням антитіла або примованих Т-клітин. Клітинна імунна відповідь індукується презентацією поліпептидних епітопів в асоціації з молекулами МНС Класу I і Класу II до активованих антиген-специфічних CD4 Т-хелперних клітин і/або CD8⁺ цитотоксичних Т-клітин. Відповідь також може включати активацію моноцитів, макрофагів, NK-клітин, базофілів, дендритних клітин, астроцитів, мікрогліальних клітин, еозинофілів або компонентів природженого імунітету.

"Імуногенний агент" або "імуноген" здатний індукувати імунну відповідь, направлену проти себе, при введенні реципієнту-ссавцеві, необов'язково разом з ад'ювантом.

У переважному варіанті здійснення вказане антитіло виявляє високу специфічність до вільного N-кінця пептиду $A\beta_{8-x}$.

Вираз "вільний N-кінцевий кінець" належить до відкритого N-кінця, тобто до амінокислотного кінця з кінцевою NH_2 -групою.

Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути поліклональними, що мають високу специфічність, або моноклональними, що мають високу специфічність.

В іншому переважному варіанті здійснення вказане антитіло виявляє високу афінність відносно пептиду $A\beta_{8-x}$.

Термін "афінність" належить до сили зв'язування антитіла з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, тобто до того, наскільки сильно антитіло зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$.

Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути поліклональними, що мають високу афінність, або моноклональними, що мають високу афінність.

Афінність моноклонального антитіла згідно з даним винаходом до N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$ визначають за допомогою аналізу кон'югування (див. приклад 3). Значення OD менше за 1 демонструють низьку афінність, а вище за 1 вказують на високу афінність моноклональних антитіл до своєї мішені.

В іншому переважному варіанті здійснення антитіла згідно з даним винаходом можуть бути поліклональними з високою специфічністю і високою афінністю або моноклональними з високою специфічністю і високою афінністю.

У більш переважному варіанті здійснення вказане антитіло специфічно направлене на паренхіматозні амілоїдні відкладення пептиду $A\beta_{8-x}$ в мозку і не взаємодіє з судинним амілоїдним відкладенням. Індукція імунної відповіді є "активною", якщо імуноген вводять для індукування антитіл або Т-клітин, реактивних до імуногену. Індукція імунної відповіді є "пасивною", якщо антитіло вводять так, що воно саме зв'язується з N-кінцевим усіченим пептидом $A\beta_{8-x}$ у ссавця.

Одним з побічних ефектів пасивної імунізації є частота мікрокрововиливів. Таке збільшення кількості мікрокрововиливів можна пояснити зв'язуванням введених антитіл з агрегованими пептидами $A\beta$ в стінках судини (див. приклад 5).

Отже, антитіла згідно з даним винаходом, що специфічно зв'язуються з паренхіматозними амілоїдними відкладеннями і не взаємодіють з судинним амілоїдним відкладенням, не будуть викликати важких побічних ефектів, що спостерігаються у антитіл проти пептиду $A\beta_{1-42}$ (див. приклад 5). У переважному варіанті здійснення даний винахід належить до антитіла, особливо до моноклонального антитіла, де x включає від 15 до 42.

У переважному варіанті здійснення даний винахід належить до моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, де варіабельна область включає одну з наступних пар амінокислотних послідовностей, що належать відповідно до легкого і важкого ланцюга:

Області, виділені сірим, належать до областей, що визначають комплементарність легкого ланцюга (CDR-Lx) або важкого ланцюга (CDR-Hx)

• Антитіло TeiA 1.6 (секретоване гібридомою IGН521)

Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLAGRYQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAST

CDR-L3

RDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFAG

(SEQ ID NO:1)

Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCAISGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTT

5

CDR-H3

EYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCATYHDYAMDYWGQ

GTSVTVSS (SEQ ID NO: 2)

• Антитіло TeiA 1.7 (секретоване гібридомою IGH522) Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

10

SSLTVTAGEKVTMNCCKSSQNLLNSGNQVNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWAST

CDR-L3

RESGVPDRFIGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDYRYPLTFGAG

(SEQ ID NO:3)

Варіабельна область важкого ланцюга:

15

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGRRLEWIAASRDKAKDYTT

CDR-H3

EYSASVKGRFIVSRDTSQSIFYLQMNALRSEDTAIYYCATYFSYAMDYWGTL

SVTVSS (SEQ ID NO:4)

20

• Антитіло TeiA 1.8 (секретоване гібридомою IGH523) Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLAVTAGERVMTMCKSSLTLLNSGSQTNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR

CDR-L3

ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAG

25

(SEQ ID NO:5)

Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATAGFTFTDQYMSWVRQPPGKALEWLA TIRNKAKGFT

CDR-H3

30

TEYSASVKGRFTISRDNSSQSILYLQMSTLRAGDSATYYCAVYGNYAMDYWG

QGTSVNVS (SEQ ID NO:6)

• Антитіло TeiA 2b.6 (секретоване гібридомою IGH524) Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

35

SSLTVTAGEKVTMCKSSQSLFNSSGRQTNYLTWFQQRPGQAPKLLIYWASTR

CDR-L3

GSGVPDRFTGSGSGTEFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAG

(SEQ ID NO:7)

Варіабельна область важкого ланцюга:

40

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANGYT

CDR-H3

TEYSASVKGRFIVSRDTSQGILYLQMSALRAEDTAIYYCAIYRYYAMDYWGQ

GTSVTVSS (SEQ ID NO: 8)

45

• Антитіло TeiA 1.1 (секретоване гібридомою IGH525)

Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMCSCTSSQSLFNSSGTQTNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR

CDR-L3

50

ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAG

SEQ ID NO:9)

Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

55

GGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFFIWVRQPPGKRLEWITASRNKNYDYK

CDR-H3

TEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCAIYRHYAMDYWGQ

GTSVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Термін "антитіло", що використовується в даний заявці, належить до білка, що складається з одного або більше поліпептидів, що по суті кодуються генами імуноглобулінів або фрагментами генів імуноглобулінів.

60

У переважному варіанті здійснення CDR варіабельної області легкого і важкого ланцюга антитіла, визначеного вище, включає одну з наступних амінокислотних послідовностей:

• Антитіло TeiA 1.6 (послідовність IGH521)

CDR варіабельної області легкого ланцюга:

5 CDR-L1:

KSSQSLLAGRYQKNYLT (SEQ ID NO: 11)

CDR-L2:

WASTRDSG (SEQ ID NO: 12)

CDR-L3:

10 QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 13)

CDR варіабельної області важкого ланцюга:

CDR-H1:

GFTFSDFYME (SEQ ID NO: 14)

CDR-H2:

15 ASRNKANDYTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 15)

CDR-H3

YHDYAMDY (SEQ ID NO: 16)

• Антитіло TeiA 1.7 (послідовність IGH522) CDR варіабельної області легкого ланцюга:

CDR-L1:

20 KSSQNLLNSGNQVNYLT (SEQ ID NO: 17)

CDR-L2:

WASTRESG (SEQ ID NO: 18)

CDR-L3:

QNDYRYPLT (SEQ ID NO: 19)

25 CDR варіабельної області важкого ланцюга:

CDR-H1:

GFTFSDFYME (SEQ ID NO: 14)

CDR-H2:

ASRDKAKDYTTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 20)

30 CDR-H3:

YFSYAMDY (SEQ ID NO: 21)

• Антитіло TeiA 1.8 (послідовність IGH523)

CDR варіабельної області легкого ланцюга:

CDR-L1:

35 KSSLTLLNSGSQTNYLT (SEQ ID NO: 22)

CDR-L2:

WASTRESG (SEQ ID NO: 18)

CDR-L3:

QNDYSYPLT (SEQ ID NO: 23)

40 CDR варіабельної області важкого ланцюга:

CDR:

GFTFTDQYMS (SEQ ID NO: 24)

CDR-H2:

TIRNKAKGFTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 25)

45 CDR-H3:

YGNYAMDY (SEQ ID NO: 26)

• Антитіло TeiA 2b.6 (послідовність IGH524)

CDR варіабельної області легкого ланцюга:

CDR-L1:

50 KSSQSLFNSGRQTNYLT (SEQ ID NO: 27)

CDR-L2:

WASTRGS (SEQ ID NO: 28)

CDR-L3:

QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 13)

55 CDR варіабельної області важкого ланцюга:

CDR-H1:

GFTFTDFYME (SEQ ID NO: 29)

CDR-H2:

ASRNKANGYTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 30)

60 CDR-H3:

YRYYAMDY (SEQ ID NO: 31)

• Антитіло TeiA 1.1 (послідовність IGH525)

CDR варіабельної області легкого ланцюга:

CDR-L1:

5 TSSQSLFNSGTQTNYLT (SEQ ID NO: 32)

CDR-L2:

WASTRESG (SEQ ID NO: 18)

CDR-L3:

QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 13)

10 CDR варіабельної області важкого ланцюга:

CDR-H1:

GFTFSDFFIE (SEQ ID NO: 33)

CDR-H2:

ASRNKNYDYKTEYSASVKG (SEQ ID NO: 34)

15 CDR-H3:

YRHYAMDY (SEQ ID NO: 35)

CDR-області згідно з даним винаходом включають не тільки повністю ідентичні CDR, але також їх варіанти, за умови, що вони зберігають специфічність до пептиду A $\beta_{8-х}$. Таким чином, вказані CDR амінокислотні послідовності, в яких один або більше амінокислотних залишків модифіковані, можуть також використовуватися як послідовності CDR. Модифіковані амінокислотні залишки в амінокислотних послідовностях варіанту CDR складають, переважно 30 % або менше, більш переважно 20 % або менше, найбільш переважно 10 % або менше, в межах всього CDR.

20 Таким чином, може використовуватися будь-яке антитіло, фрагмент, молекула або ліганд, що включає щонайменше одну з вказаних послідовностей CDR або гомологічних послідовностей.

CDRs мають основне значення для впізнання епітопу і зв'язування антитіла. Однак в залишки, які складають CDRs, можуть бути внесені зміни, без впливу на здатність антитіла впізнавати і зв'язувати відповідний епітоп. Наприклад, можуть бути зроблені зміни, які не стосуються впізнання епітопу, але все ж збільшують афінність зв'язування антитіла з епітопом.

У ряді досліджень були вивчені ефекти від введення однієї або більше амінокислотних замін в різні положення в послідовності антитіла, на основі знання первинної послідовності антитіла, її властивостей, такої як зв'язування і рівень експресії (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol Biol, 254: 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 535-539).

У цих дослідженнях (так званих методах дозрівання афінності) були одержані еквіваленти первинного антитіла шляхом зміни послідовностей генів CDR1, CDR2, CDR3 важкого і легкого ланцюга або каркасних областей з використанням таких методів, як олігонуклеотид-опосередкований сайт-направлений мутагенез, касетний мутагенез, помилково-направлена ПЛР, перетасовування ДНК або штами-мутатори E. coli (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, в "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Вказані методи зміни послідовності первинного антитіла призвели до підвищення афінності вторинних антитіл (Gram, H. et al, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2: 169-179; Thompson, J. et al., 1996, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., III: 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276: 27622-27628).

Відповідно до подібної направленої стратегії зміни одного або більше амінокислотного залишку антитіла, послідовності антитіла, описані в даному винаході, можуть використовуватися для одержання антитіл, які специфічно зв'язуються з N-кінцевою областю пептиду A $\beta_{8-х}$, як визначено вище, що мають поліпшені функції, включаючи поліпшену афінність до N-кінцевої області пептиду A $\beta_{8-х}$.

50 Переважні амінокислотні заміни є такими замінами, які: (1) зменшують сприйнятливість до протеолізу, (2) зменшують сприйнятливість до окислення, (3) змінюють афінність зв'язування при формуванні білкових комплексів, і (4) додають або змінюють інші фізико-хімічні або функціональні властивості таких аналогів. Аналоги можуть включати різні мутеїні послідовності, відмінні від природної послідовності пептиду. Наприклад, одиночні або множинні амінокислотні заміни (переважно, консервативні амінокислотні заміни) можуть бути зроблені в природній послідовності (переважно, в частині поліпептиду за межами домену (доменив), що формує

міжмолекулярні контакти. Консервативна амінокислотна заміна не повинна по суті змінювати структурні особливості вихідної послідовності (наприклад, амінокислотна заміна не повинна мати тенденції порушувати спіраль, присутню в вихідній послідовності, або порушувати інші типи повторної структури, яка характеризує вихідну послідовність). Приклади визнаних в рівні

техніки вторинних і третинних структур поліпептидів описані в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, а також в Thornton et al., 1991, *Nature*, 354: 105, які включені в дану заявку шляхом посилання.

Поліпшені антитіла також включають такі антитіла, які мають поліпшені властивості,

одержані за допомогою стандартних методів імунізації тварин, формування гібридом і відбору антитіл зі специфічними характеристиками.

Також можуть використовуватися лінії клітин, спеціально сконструйовані для продукції поліпшених антитіл. Зокрема, у вказаних лініях змінена регуляція шляху глікозилювання, що призводить до вироблення антитіл, які є недостатньо фукозильованими або навіть повністю дефукозильованими. Такі клітинні лінії і способи їх створення розкриті, наприклад, в Shinkawa et al. (2003, *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473), Ferrara et al. (2006, *J. Biol. Chem.* 281(8): 5032-5036; 2006, *Biotechnol Bioeng.* 93(5): 851-61), EP 1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987, а також WO 99/54342.

В іншому переважному варіанті здійснення даний винахід належить до антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду A β _{8-х}, де вказане антитіло мічене сполукою, вибраною з групи, що включає: радіонуклід, флуоресцентну мітку, ферментну мітку, субстрат ферменту, кофактор ферменту, інгібітор ферменту і гаптен.

Специфічна мітка або детектована група, що використовується в аналізі, не є зазвичай критичним аспектом винаходу, за умови, що вони суттєво не перешкоджають специфічному зв'язуванню антитіла, що використовується в аналізі. Детектована група, що використовується в аналізі, може бути будь-яким матеріалом, що має детектовану фізичну або хімічну властивість. Такі детектовані мітки добре відомі в галузі імуноаналізів і, як правило, майже будь-яка мітка, що використовується в таких методах, може бути застосована в способі даного винаходу.

Таким чином, мітка являє собою будь-яку композицію, що виявляється за допомогою спектроскопічних, фотохімічних, біохімічних, імунохімічних, електричних, оптичних, радіологічних або хімічних способів. Використовувані мітки даного винаходу включають, крім інших, магнітні гранули (наприклад, Dynabeads™), флуоресцентні барвники (наприклад, флуоресцеїнізотіоціанат, техаський червоний, родамін), радіомітки (наприклад, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C або ³²P), ферменти (наприклад, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу і інші, що зазвичай використовуються в ELISA), а також колориметричні мітки, такі як гранули колоїдного золота, кольорового скла або пластика (наприклад, полістиролу, поліпропілену, латексу і т.д.).

Мітка може бути приєднана напряму або опосередковано до бажаного компонента аналізу згідно зі способами, відомими в рівні техніки. Як показано вище, може використовуватися широка різноманітність міток, при цьому вибір мітки залежить від необхідної чутливості, простоти кон'югування із сполукою, вимог стабільності, доступного обладнання і умов утилізації. Нерадіоактивні мітки часто приєднують посередніми способами.

Зазвичай молекулу ліганду (наприклад, біотину) ковалентно приєднують до антитіла. Потім ліганд приєднують до молекули анти-ліганду (наприклад, стрептавідину), яка є або безпосередньо детектованою, або ковалентно зв'язана з сигнальною системою, такою як детектований фермент, флуоресцентна сполука або хемілюмінесцентна сполука. Може застосовуватися множина лігандів і анти-лігандів. Якщо ліганд має природний анти-ліганд, наприклад, біотин, тироксин і кортизол, він може застосовуватися в сполучі з міченими, природними анти-лігандами. Альтернативно в поєднанні з антитілом може застосовуватися гаптенна або антигенна сполука.

Антитіла також можуть бути кон'юговані безпосередньо до сполук, що генерують сигнал, наприклад, шляхом кон'югування з ферментом або флюорофором. Ферменти, що представляють інтерес як мітки, передусім, є гідролазами, особливо фосфатазами, естеразами і глікозидазами, або оксидоредуктазами, особливо пероксидазами.

Флуоресцентні сполуки включають флюоресцин і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон і т.д. Хемілюмінесцентні сполуки включають люциферин і 2,3-дигідрофталазинедіони, наприклад, люмінол. Огляд інших детектованих або сигнальних систем можна знайти в патенті США 4391904.

Пристрій для детекції міток відомий в рівні техніки. Таким чином, наприклад, якщо мітка являє собою радіоактивну мітку, пристрій для детекції включає сцинтиляційний лічильник або фотографічну плівку, як в авторадіографії. Якщо мітка являє собою флуоресцентну мітку, вона

може бути виявлена при збудженні флюорофору відповідною довжиною хвилі, з подальшим детектуванням резуютьуючої флюоресценції. Флюоресценція може бути виявлена візуально, за допомогою фотографічної плівки, за допомогою електронних датчиків, таких як прилади із зарядовим зв'язком (CCD) або фотопомножувачі і т.п.

Аналогічним чином, ферментні мітки можуть бути виявлені за допомогою введення придатних субстратів ферменту, з подальшим детектуванням продукту реакції, що утворюється. Нарешті, прості колориметричні мітки можуть бути виявлені за допомогою простого візуального спостереження кольору мітки.

У переважному варіанті здійснення моноклональне антитіло являє собою гуманізоване антитіло.

Під "гуманізованим антитілом" розуміється генетично сконструйоване антитіло, в якому мінімальна частина миші з мишачого антитіла перенесена в людське антитіло; зазвичай гуманізовані антитіла є на 5-10 % мишачими, і на 90-95 % людськими.

Гуманізовані антитіла мають перевагу, яка полягає в здатності протистояти відповідям НАМА (людських антитіл, направлених до антитіл миші) і НАСА (людських антитіл, направлених до химерних антитіл), що спостерігаються при введенні мишачих і химерних антитіл, і викликають мінімальну, або взагалі не викликають, відповідь людської імунної системи проти них.

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до гібридом, що продукують моноклональні антитіла, як визначено вище, тобто, які специфічно зв'язуються з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$ і не впізнають ні $A\beta_{1-40}$, ні $A\beta_{1-42}$, і особливо, варіабельна область яких включає одну з пар амінокислотних послідовностей, визначених вище, і які виявляють високу специфічність.

У переважному варіанті здійснення, вищевизначена гібридома була депонована 23 серпня 2007 року, в:

BCCM/LMBP Plasmid Collection
Department of Molecular Biology
Ghent University
'Fiers-Schell-Van Montagu' building
Technologiepark 927
B-9052 Gent-Zwijnaarde
BELGIUM

під наступними номерами:

TeiA 1.6 або 2.6 F4C2 (IGH521) → LMBP 6594CB
TeiA 1.7 або 2.8 A3F8 (IGH522) → LMBP 6595CB
TeiA 1.8 або 1.3 B12H3 (IGH523) → LMBP 6596CB
TeiA 2b.6 або 2.13 E5E4 (IGH524) → LMBP 6597CB
TeiA 1.1 або 3.46 B10E7 (IGH 525) → LMBP 6598CB

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до пептидного препарату для індукції імунної відповіді, що призводить до вироблення антитіла, яке ефективно зменшує амілоїдні відкладення і забезпечує виділення моноклонального антитіла.

Під "пептидним препаратом" розуміється короткий синтетичний пептид з вільним N-кінцем, який імітує вільний N-кінець N-усічених $A\beta$ пептидів.

Використовуваний пептид являє собою наступне: $A\beta_{8-x}$ імітуючий пептид: SGYGVHHGC-KLH

У цьому випадку KLH являє собою гемоціанін лімфи равлика, який приєднаний до цистеїну через дисульфідний місток. Послідовність, що відповідає $A\beta$, підкреслена, і за нею іде спейсерна амінокислота - гліцин. $A\beta_{8-x}$ подібний IGP-2119 (PG127) Таблица 2.

Пептидний препарат змішували з фосфатно-сольовим буфером з додаванням ад'юванту Фрейнда для внутрішньочеревинних ін'єкцій (Фіг. 2). Через 24 тижні імунну відповідь аналізували за допомогою TAPIR (Фіг. 3), а також визначали ефект на амілоїдні відкладення за допомогою вестерн-блоттинга (Фіг. 4).

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до способів одержання вищевизначеного антитіла, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$ і не розпізнає $A\beta_{1-42}$, де x включає від 11 до 42, переважно, 15-42, має високу специфічність, включає стадію імунізації відповідної тварини пептидом $A\beta_{8-x}$ і Т-хелперним епітопом, зокрема пептидом $A\beta_{8-x}$, злитим з Т-хелперним епітопом, або $A\beta_{8-x}$ розгалуженим пептидом, зокрема пептидом $A\beta_{8-15}$.

Вираз "пептид $A\beta_{8-x}$, злитий з Т-хелперним епітопом" належить до з'єднання пептиду $A\beta_{8-x}$ з Т-хелперним епітопом згідно з Livingston et al., (2002), що містить кінцевий цистеїн для зв'язування KLH.

Вираз " $A\beta_{8-x}$ розгалужений пептид" належить до пептидів $A\beta_{8-x}$, зв'язаних з пептидним спейсером, що містить кінцевий цистеїн для зв'язування KLH.

Для фахівця не було очевидне одержання визначених вище антитіл, оскільки згідно зі стандартним способом імунізації п'ятьма пептидами ($A\beta_{1-8}$, $A\beta_{5-13}$, $A\beta_{6-14}$, $A\beta_{8-15}$ і $A\beta_{9-17}$) будь-яке специфічне антитіло, секретоване гібридомою, не може бути виділене, і тому необхідно було проводити імунізацію пептидом $A\beta_{8-x}$ і епітопом Т-хелпера, зокрема пептидом $A\beta_{8-x}$, злитим з епітопом Т-хелпера, або імунізувати розгалуженим $A\beta_{8-x}$ пептидом.

У переважному варіанті здійснення даний винахід належить до способу одержання антитіла, визначеного вище, де вказане антитіло специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-15}$, не впізнає $A\beta_{1-42}$ і виявляє високу афінність відносно пептиду $A\beta_{8-15}$, як визначено за допомогою вестерн-блоттинга.

"Вестерн-блоттинг" є методом виявлення специфічного білка в даному зразку тканини, гомогенаті або екстракті.

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до такого антитіла, що специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, яке одержане способом, вказаним вище.

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до способу визначення *in vitro* амілоїдного навантаження у ссавця, що включає наступні стадії:

(i) кількісне визначення рівня N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ в рідинах тіла вказаного ссавця із застосуванням антитіла, визначеного вище,

(ii) порівняння рівня антитіла вказаного ссавця з рівнем антитіла, одержаним у контрольного ссавця, і

(iii) визначення зі стадії (ii), чи страждає вказаний ссавець неврологічним захворюванням, за умови, що рівень N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ змінений відносно рівня, виміряного у контрольного ссавця, і зокрема є більш високим, ніж рівень, виміряний у контрольного ссавця.

Ссавець, що досліджується в даному винаході, може бути ссавцем, виключаючи людину, наприклад (крім інших) коровою, свинею, вівцею, козою, конем, мавпою, кроликом, зайцем, собакою, кішкою, мишею, щуром, лосем, оленем або тигром. У переважному варіанті здійснення ссавець є приматом.

У переважному варіанті здійснення ссавець у вищезгаданому способі є людиною, більш переважно ссавець є дорослою людиною.

В іншому переважному варіанті здійснення даний винахід належить до вищезгаданого способу, в якому специфічність і чутливість вказаного антитіла до $A\beta_{8-42}$ перевищує 60 %, переважно складає від приблизно 60 до приблизно 100 %, більш переважно перевищує 80 %.

Термін "чутливість" належить до міри виявлення пептиду $A\beta_{8-42}$, який можна виявити за допомогою вказаного способу. (Див. *Neurobiology of aging*, Vol 19, N°2, p109-116, 1998: Consensus report of the working group on: "Molecular and biochemical markers of AD"). Ця робоча група встановлює стандарти для діагностичного набору AD і вказує, що чутливість і специфічність повинні бути >80 %.

В іншому переважному варіанті здійснення вказана рідина тіла вищезгаданого способу являє собою спинномозкову рідину (СМР) або кров.

Термін "спинномозкова рідина" або (СМР) включає всю спинномозкову рідину або її похідні, або її фракції, добре відомі фахівцям, кваліфікованим в галузі техніки. Таким чином, зразок спинномозкової рідини може включати різні фракціоновані форми спинномозкової рідини або може включати різні розріджувачі, додані з метою сприяння зберіганню або використанню в конкретному аналізі. Такі розріджувачі добре відомі фахівцям і включають різні буфери, консерванти і т.п.

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до способу визначення сприйнятливості ссавця до захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, наприклад, хвороби Альцгеймера, до способу визначення у ссавця ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, наприклад, хвороби Альцгеймера, до способу скринінгу у ссавця кліренсу β -амілоїдного відкладення, або до способу прогнозу у ссавця рівня β -амілоїдного відкладення, де вказаний спосіб включає наступні стадії:

(i) визначення кількості пептиду $A\beta_{8-x}$ у вказаного ссавця із застосуванням антитіла, вказаного вище,

(ii) порівняння визначеної на етапі (i) кількості з кількістю антитіла, специфічної до вказаного пептиду N-кінцевої області $A\beta_{8-x}$ у контрольного ссавця, і

(iii) висновок з порівняння на стадії (ii), чи є ссавець сприйнятливим до захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, таким як хвороба Альцгеймера, чи зазнає ссавець ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, таким як хвороба Альцгеймера, чи усунене β -амілоїдне відкладення в організмі ссавця, або яким є рівень β -амілоїду у вказаного ссавця.

Збільшення рівня N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ в мозку ссавця, що досліджується, наприклад, може бути ознакою того, що ссавець є сприйнятливим або схильним до ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду. Це також може вказувати, що $A\beta$ відкладення в організмі ссавця ще не усунене.

5 Підвищені рівні N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ в конкретних рідинах тіла після вакцинації або терапії є ознакою рівня $A\beta$ навантаження (DeMattos et al., 2002). Головним чином, в конкретних рідинах тіла виявляється N-кінцевий розчинний фрагмент APP. Присутність таких N-кінцевих розчинних фрагментів APP вказує на неправильне розщеплення APP, що призводить до утворення N-кінцевих усічених $A\beta$ варіантів і, як наслідок, до збільшеної сприйнятливості або до

10 ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду у ссавця. У переважному варіанті здійснення кількість антитіла, специфічного до вказаного пептиду N-кінцевої області $A\beta_{8-x}$, що використовується у вищезгаданому способі, визначається в зразку тканини, одержаному від вказаного ссавця.

Під "тканиною" розуміється тканина мозку.

15 Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до набору, що включає щонайменше один буфер і щонайменше одну сполуку для детекції, щонайменше одне антитіло, специфічне до N-усіченого $A\beta_{8-x}$, як визначено вище.

У переважному варіанті здійснення набір, визначений вище, додатково включає переважно мічене вторинне антитіло, яке зв'язується з вищезгаданим антитілом.

20 Наприклад, антитіла можуть бути зв'язані безпосередньо з твердою підкладкою, на якій вони імібілізовані. Вказані імібілізовані антитіла зв'язують N-кінцевий усічений пептид $A\beta_{8-x}$ винаходу, присутній в пробі, а потім детектуються іншим антитілом.

В іншому аспекті даний винахід належить до терапевтичної композиції, що включає як активний компонент вищезгадане антитіло або синтетичні пептиди з вільним N-кінцем, що імітує вільний N-кінець N-усічених $A\beta$ пептидів, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

25 Кількість антитіла, введеного або доставленого людині, повинна бути достатньою, щоб спричинити суттєве зниження рівнів β -амілоїду в мозку людини. Відповідна кількість залежить від різних параметрів (наприклад, від конкретного антитіла, що застосовується, ваги людини і рівнів ендogenous β -амілоїду), і повинна визначатися в кожному конкретному випадку.

30 Дозування і частота введення також можуть варіювати залежно від того, чи є лікування профілактичним або терапевтичним.

У переважному варіанті здійснення вищезгадана терапевтична композиція є придатною для введення людині дози антитіла від 1 мг/кг/день до 200 мг.

35 Пацієнти, що підлягають лікуванню, включають людей з ризиком захворювання, але без вияву симптомів, а також пацієнтів з виявом симптомів. У випадку хвороби Альцгеймера, фактично будь-яка людина зазнає ризику розвитку хвороби Альцгеймера, якщо він або вона живуть досить довго. Отже, дані антитіла можуть бути введені профілактично основній популяції без будь-якої оцінки ризику для вказаного пацієнта. Дані антитіла особливо ефективні для людей, які мають підтверджений генетичний ризик розвитку хвороби Альцгеймера. Такі

40 люди включають тих, які мають родичів, що страждають від вказаного захворювання і тих, ризик захворювання яких визначається аналізом генетичних або біохімічних маркерів.

Введення людині вказаних антитіл згідно з даним винаходом може бути здійснене внутрішньовенно.

45 Іншим способом доставки в мозок є пряма інфузія антитіл згідно з даним винаходом в мозок людини. Згідно з іншим аспектом винахід належить до вакцини, що включає як активний компонент вищезгадане антитіло, його фрагменти або похідні, або синтетичні пептиди з вільним N-кінцем, що імітує вільний N-кінець N-усічених $A\beta$ пептидів, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

У переважному варіанті здійснення вищезгадана вакцина є придатною для введення людині 50 дози антитіла від 1 мг/кг/день до 200 мг.

Вакцини або терапевтичні композиції даного винаходу викликають імунну відповідь проти специфічного N-кінцевого усіченого пептиду $A\beta_{8-x}$ винаходи.

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до застосування щонайменше одного з вищезгаданих антитіл для одержання лікарського засобу або вакцини, призначених для 55 профілактики або лікування хвороби Альцгеймера.

Під терміном "профілактики захворювання", що використовується в даній заявці, розуміється інгібування або запобігання початку захворювання, інгібування або запобігання початковим симптомам захворювання (тобто, утворенню і/або агрегації варіантів $A\beta$), інгібування появи клінічних симптомів захворювання.

Термін "лікування захворювання", що використовується в даній заявці, включає суттєве інгібування захворювання, суттєве сповільнення або припинення прогресування захворювання, суттєве поліпшення клінічних симптомів захворювання або суттєве запобігання появі клінічних симптомів захворювання.

5 Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до застосування щонайменше одного з вищезгаданих антитіл для одержання лікарського засобу або вакцини, призначених для усунення β -амілоїдного навантаження.

Термін "усунення β -амілоїдного навантаження" означає, що β -амілоїдні відкладення видалені з тканини головного мозку. Видалення β -амілоїдних відкладень з мозку пацієнтів з AD, із застосуванням вакцини проти A β пептиду, є новим підходом, який відкриває перспективи лікування (Schenk et al., 2001, Immunotherapy with beta-amyloid for Alzheimer's disease: a new frontier. DNA Cell Biol. 20: 679-681).

Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до способу усунення β -амілоїдного навантаження у ссавця, що включає введення вищезгаданої композиції вказаного ссавця.

15 Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до застосування пептидної композиції, визначеної вище, для індукції імунної відповіді у ссавця, що страждає або сприйнятливий до розвитку хвороби Альцгеймера.

ОПИС ФІГУР

20 На Фіг. 1 представлена часткова амінокислотна послідовність APP770, що показує амінокислотну послідовність A β з позначеними сайтами розщеплення α -, β - і γ -секретазою.

На Фіг. 2A і 2B показана схема внутрішньочеревинних ін'єкцій пептидним препаратом (2A) і титр антитіла, виміряний при кожному відборі крові (2B).

вісь X: розведення сироватки

вісь Y: оптична густина

25 На Фіг. 3A-3D показане застосування сироваток імунізованих мишей для виявлення присутності або відсутності β -амілоїдного відкладення в тканині головного мозку мишей з подвійним трансгеном APP \times PS1:

3A і 3B: сироватка миші не-респондера (збільшення: $\times 25$ і $\times 100$, відповідно),

3C і 3D: сироватка Tgunc8 імунізованої миші (збільшення: $\times 25$ і $\times 100$, відповідно).

30 На Фігурах 4A і 4B показане навантаження A β , визначене за допомогою вестерн-блоттинга в імунізованих і контрольних мишей (4A), на гістограмі показана ефективність імунізації, виражена в процентах від навантаження A β -42 в порівнянні з контролем (PBS).

Фіг. 5 є схематичним оглядом положення праймерів для легкого ланцюга і важкого ланцюга.

35 На Фіг. 6 наведений 2D аналіз в гелі екстракту в мурашиній кислоті з мозку людини з хворобою Альцгеймера і суміші повнорозмірних синтетичних A β пептидів (A β ₂₋₄₂, A β ₃₋₄₂, A β ₄₋₄₂, A β ₅₋₄₂, A β ₇₋₄₂, A β ₈₋₄₂, A β ₉₋₄₂ (імуноблоти, одержані з 7G12 еквівалентні 21F12 (A β ₁₋₄₂), як описано Sergeant et al. (2003), TeiA 1.1, TeiA 1.8, і TeiA 2b.6).

На Фіг. 7 показаний аналіз імобілізованого антитіла 4D7A3 (42-С-кінцевого специфічного антитіла), а також TeiA 2b.6, TeiA1.8, TeiA1.7 і TeiA1.6.

40 На Фіг. 8A і 8B показана специфічність моноклонального антитіла TeiA1.6 до паренхіматозного β -амілоїду. 8A: мічення паренхіматозних (стрілки) і судинних β -амілоїдних відкладень (кінці стрілок) класичним A β антитілом 6E10. 8B: мічення тільки паренхіматозних (стрілки) β -амілоїдних відкладень 8-усіченим A β (TeiA1.6), але не навколосудинних відкладень (кінці стрілок) в суміжному відділі мозку.

45 На Фіг. 9A-9J показані результати внутрішньочерепної ін'єкції (в правий гіпокамп) 4G8 антитіла (комерційного моноклонального антитіла) мишам n°47 віком 7 місяців.

9A, 9D і 9G: положення відділів мозку відносно точки ін'єкції.

9B, 9E і 9H: імуногістохімічні зображення відповідних відділів мозку, на яких показане відкладення β -амілоїдного пептиду, виявлене за допомогою "детектуючого" антитіла 6E10.

50 9C, 9F і 9I: навантаження β -амілоїдного пептиду, обчислене з Фіг. 9B, 9E і 9H, відповідно, в різних підвідділах мозку в кожній півкулі (Hipp: гіпокамп, C \times 1: кортикальна область 1 (тильна), C \times 2: кортикальна область 2 (латеральна), C \times 3: кортикальна область 3 (латеро-вентральна), Th: таламічна). Відношення: забарвлена площа/загальна площа вказаної області. L: ліворуч, R: праворуч (введення).

55 9J: обчислене імунохімічно навантаження β -амілоїдного пептиду в основі кожної півкулі тільки в H відділі мозку.

На Фіг. 10A-10J показана внутрішньочерепна ін'єкція (в правий гіпокамп) антитіла TeiA1.6 мишам n°47 віком 7 місяців.

10A, 10D і 10G: положення відділів мозку відносно точки ін'єкції.

10B, 10E і 10H: імуногістохімічні зображення відповідних відділів мозку, на яких показане відкладення амілоїдного пептиду, виявлене за допомогою "детектуючого" антитіла 4G8.

10C, 10F і 10I: навантаження амілоїдного пептиду, обчислене з фігур 10B, 10E і 10H, відповідно, в різних підвідділах мозку в кожній півкулі (Hipp: гіпокамп, C×1: кортикальна область 1 (тильна), C×2: кортикальна область 2 (латеральна), C×3: кортикальна область 3 (латеро-вентральна), Th: таламічна). Відношення: забарвлена площа/загальна площа вказаної області. L: ліворуч, R: праворуч (введення).

10J: обчислене імунохімічно навантаження амілоїдного пептиду в основі кожної півкулі тільки в B і E відділі мозку.

10 На Фіг. 11 показане співвідношення амілоїдного відкладення з ін'єкцією (антитіла TeiA1.6) і без ін'єкції (контроль) в різних підобластях мозку (Hipp: гіпокамп, C×1: кортикальна область 1 (тильна), C×2: кортикальна область 2 (латеральна), C×3: кортикальна область 3 (латеро-вентральна), Th: таламічна) після внутрішньочерепної ін'єкції (в правий гіпокамп) моноклонального антитіла TeiA1.6. Показане середнє значення співвідношень для 4 тварин з кількісним аналізом трьох відділів мозку для кожного (дані представлені як середнє \pm SEM).

15 На Фіг. 12A-12J показана внутрішньочерепна ін'єкція (в правий гіпокамп) антитіла TeiA1.8 мишам п'ятого віком 7 місяців.

12A, 12D і 12G: показане положення відділів мозку відносно точки ін'єкції.

20 12B, 12E і 12H: імуногістохімічні зображення відповідних відділів мозку, на яких показане відкладення амілоїдного пептиду, виявлене за допомогою "детектуючого" антитіла 4G8.

12C, 12F і 12I: навантаження амілоїдного пептиду, обчислене з Фіг. 12B, 12E і 12H, відповідно, в різних підвідділах мозку в кожній півкулі (Hipp: гіпокамп, C×1: кортикальна область 1 (тильна), C×2: кортикальна область 2 (латеральна), C×3: кортикальна область 3 (латеро-вентральна), Th: таламічна). Відношення: забарвлена площа/загальна площа вказаної області. L: ліворуч, R: праворуч (введення).

25 12J: обчислене імунохімічно навантаження амілоїдного пептиду в основі кожної півкулі, тільки в H відділі мозку.

30 На Фіг. 13 показане співвідношення амілоїдного відкладення з ін'єкцією (антитіла TeiA1.8) і без ін'єкції (контроль) в різних підобластях мозку (Hipp: гіпокамп, C×1: кортикальна область 1 (тильна), C×2: кортикальна область 2 (латеральна), C×3: кортикальна область 3 (латеро-вентральна), Th: таламічна) після внутрішньочерепної ін'єкції (в правий гіпокамп) моноклонального антитіла TeiA1.6. Показане середнє значення відносин для 4 тварин з кількісним аналізом трьох відділів мозку для кожного (дані представлені як середнє \pm SEM).

ПРИКЛАДИ

35 Приклад 1: Імунізація подвійних трансгенних мишей пептидним препаратом N-trunc 8 і вплив на навантаження амілоїду в мозку

Подвійній трансгенній миші APP Swedish London x Presenilin 1 (Blanchard et al., 2003 Exp Neurology 184: 247; WO 0120977) кожні три тижні вводили 50 мкг пептидів N-Trunc 8 (Фіг. 2A). Загальна тривалість імунізації становила 21 тиждень. Мишам, як в групі негативного, так і позитивного контролю, вводили фосфатно-сольовий буфер або агрегований пептид A β ₁₋₄₂, відповідно. Титр антитіл визначали за допомогою прямого ELISA проти пептидів Trunc 8 (Фіг. 2B).

45 Сироватки з п'ятого відбору крові імунізованих мишей використовували для проведення тесту на імунореактивність тканини до амілоїдних бляшок (TAPIR) (Christoph Hock, Roger M. Nitsch, Clinical Observations with AN-1792 Using TAPIR Analyses Neurodegenerative Diseases 2005; 2:273-276) (Фіг. 3). Сироватку від миші нереспондера використовували як негативний контроль. Амійодні відкладення детектували з використанням сироваток, одержаних від мишей, імунізованих пептидами Trunc-8.

50 Вплив імунізації на відкладення A β досліджували з використанням екстрактів A β пептидів в мурашиній кислоті і детекції за допомогою вестерн-блоттинга, як описано раніше (Casas et al., 2004) (Фіг. 4A). Сумарну кількість A β -42 вимірювали і порівнювали з контролем (PBS) і виражали в процентах по відношенню до контролю (100 %). На гістограмі показане визначення кількості для кожного експерименту (Фіг. 4B).

55 Приклад 2: Характеристика варіабельних областей моноклональних антитіл з гібридом IGН524, IGН525, IGН521, IGН522, IGН523

Результати аналізу послідовності ДНК оцінювали шляхом трансляції відповідної відкритої межі зчитування в амінокислотну послідовність і вирівнювання з консенсусними каркасними областями важкого і легкого ланцюгів антитіла.

Аналіз даних

Попередні дані секвенування (хроматограм ДНК) одержували за допомогою Software v5.2 (Applied Biosystems) і KB basecaller v1.2 (Applied Biosystem), а потім інтерпретували і редагували з використанням Sequencher 4.1.2. Загалом, збирали результати секвенування двониткових послідовностей і зв'язували консенсусну послідовність з базою даних Lotus Notes Custom Sequencing Service Request (CSSR) і зберігали з привласненим номером проекту CSSR.

Результати

Виділення РНК, ЗТ-ПЛР, клонування і депонування.

У Таблиці 1 для кожної гібридоми/MAb наведене джерело і вказаний тип клітин, що використовуються для екстракції РНК, а також відповідна комбінація праймерів для кожної важкого або легкого ланцюгів антитіла, які забезпечили успішне одержання специфічного клонованого ПЛР фрагмента.

Аналіз послідовності

Аналіз послідовності ДНК з подальшим вирівнюванням для кожної варіабельної області виявив можливий консенсус для кожної гібридоми/MAb. Гіперваріабельні області (CDR) були ідентичні для всіх клонів, що мають одну варіабельну область.

Огляд і вирівнювання одержаних фінальних консенсусних послідовностей наведений в додатку 1. Показані теоретично передбачені петлі CDR (на основі правил консенсусних послідовностей).

• гіперваріабельні області (CDR), відмічені в консенсусних послідовностях, були знайдені на основі загальнодоступних правил Кебата (Reczko et al., 1995) або аналізу загальнодоступного моделювання (Honegger et al., 2001). CDR відмічені тільки для дослідницького/неофіційного використання.

IGH524, TeiA 2b.6

Результати, одержані для важкого і легкого ланцюга MAb TeiA 2b.6 (2.13E5E4), виділеного з гібридоми IGH524, були в основному точними, незначні неточності і/або відмінності розташовані головним чином в каркасних областях. Встановлені повні варіабельні області і N-кінцеву область (включаючи найбільшу частину CDR1) обох ланцюгів зрілого антитіла підтверджували секвенуванням N-кінця очищеного антитіла.

IGH521 (TeiA 1.6), IGH522 (TeiA 1.7), IGH523 (TeiA 1.8), IGH525 (TeiA 1.1)

Результати для всіх важких і легких ланцюгів MAb TeiA 1.6 (2.6F4C2, IGH521), TeiA 1.7 (2.8A3F8, IGH522), TeiA 1.8 (1.3B12H3, IGH523) і TeiA 1.1 (3.46B10E7, IGH525) також були точними. Вирівнювали вісім послідовностей клонованих PCR продуктів і щонайменше три ідентичних послідовності співпали з консенсусною послідовністю. Повні варіабельні області визначали вирівнюванням з послідовністю, одержаною з гібридоми IGH524.

Таблиця 1

ПЛР праймери

IG #	Назва	Послідовність олігонуклеотиду (5'→3')	Посилання
1010500	Rev-CH-IgG1-2a	TGGACAGGGATCCAGAGTTC	Kabat et al.
1009565	MLALT3.RV	GRAGTCACAKACYCAGGTCTTY	Coloma et al.
18700	V _H 1BACK	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG	Orlandi et al.
18696	MJK2FONX	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC	Orlandi et al.
19735	mIg1rev (aal27-134)	AGTTTGGGCAGCAGATCC	Kabat et al.
19736	mIgKappaRev (aa120-125)	GTAACTGCTCACTGCATGG	Kabat et al.
18698	VK2BACK	GACATTGAGCTACCCAGTCTCCA	Orlandi et al.
18694	MJK5FONX	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	Orlandi et al.

Kabat et al. (Sequences of proteins of immunological interest. National Institutes of Health Publication No. 91-3242, 5th ed., 1991, United States Department of Health and Human Services, Bethesda, MD)

Coloma et al. (Novel vectors for the expression of antibody molecules regions generated by polymerase chain reaction. J. Immunol Methods, 1992; 152(I):89-104)

Orlandi et al. (Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 May; 86(10):3833-7)

IGH	Назва	Ланцюг Ab	Пара праймерів	ICCG
524	TeiA 2b.6 (2.13E5E4)	легкий	1009565/18686	6152
		важкий	18700/1010500	6151
521	TeiA 1.6 (2.6F4C2)	легкий	18698/18696	6233
		важкий	18700/19735	6232
522	TeiA 1.7 (2.8A3F8)	легкий	18698/18696	6258
		важкий	18700/19735	6236
523	TeiA 1.8 (1.3B12H3)	легкий	18698/18694	6235
		важкий	18700/1010500	6234
525	TeiA 1.1 (3.46B10E7)	легкий	1009565/197368	6268
		важкий	18700/1010500	6231

Додаток 1:

Послідовність IGH524

5 Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLFNSORQTM**YLTWFQQRPGQAPKLLIYWASTRGSGVP

CDR-L3

DRFTGSGSGTEFTLTISVQAEDLAVYYC**QNDYTYPLT**FGAG (SEQ ID NO: 7)

10 Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATSG**FTFTDFYME**WVRQPPGKRLEWIA**ASRNKANGYTTE**YSA

CDR-H3

SVKGRFIVSRDTSQGILYLQMSALRAEDTAIYYCAI**YRY**YAMDYWGQGTSVTVSS

15 (SEQ ID NO: 8)

Послідовність IGH521

Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLLAGRYQKN**YLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRDSGV

20 CDR-L3

PDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC**QNDYTYPLT**FAG (SEQ ID NO: 1)

Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCAIS**GFTFSDFYME**WVRQPPGKRLEWIA**ASRNKANDYTTE**YSAS

25 CDR-H3

VKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCAT**YHD**YAMDYWGQGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 2)

Послідовність IGH525

Варіабельна область легкого ланцюга:

30 CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMSC**TSSQSLFNSGTQTN**YLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP

CDR-L3

DRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC**QNDYTYPLT**FGAG (SEQ ID NO:9)

Варіабельна область важкого ланцюга:

35 CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATSG**FTFSDFFIE**WVRQPPGKRLEWIT**ASRNKNYDYKTE**YSAS

CDR-H3

VKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCAI**YRH**YAMDYWGQGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 10)

40 Послідовність IGH522

Варіабельна область легкого ланцюга:

CDR-L1 CDR-L2

SSLTVTAGEKVTMNC**KSSQNLLNSGNQV**NYLTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGV

CDR-L3

45 PDRFIGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYC**QNDYRYPLT**FGAG (SEQ ID NO:3)

Варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATSG**FTFSDFYME**WVRQPPGRRLEWIA**ASRDKAKDYTTE**YSA

CDR-H3

SVKGRFIVSRDTSQSIFYLQMNALRSEDTAIYYCATYFSYAMDYWGLGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 4)

Послідовність IGH523

Варіабельна область легкого ланцюга:

5

CDR-L1 CDR-L2

SSLAVTAGERVMTMSCKSSLTLLNSGSQTNLYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP

CDR-L3

DRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAG (SEQ ID NO:5)

Варіабельна область важкого ланцюга:

10

CDR-H1 CDR-H2

GGLVQPGGSLRLSCATAGFTFTDQYMSWVRQPPGKALEWLATIRNKAKGFTTEYSA

CDR-H3

SVKGRFTISRDNSSQSYLYLQMSTLRAGDSATYYCAVYGNYAMDYWGQGTSVNVSS

(SEQ ID NO: 6)

15

Приклад 3: Антитіла, специфічні до N-усіченого-8 A β і (обмежена) характеристика під час клонування)

П'ятнадцяти мишам Balb-C вводили суміш з 5 коротких синтетичних A β пептидів (50 мкг KLH-злитих пептидів на мишу). Одна миша померла з невідомої причини. Пептиди відповідали першим восьми N-кінцевим залишкам, відповідно, A β ₁₋₈, A β ₅₋₁₃, A β ₆₋₁₄, A β ₈₋₁₅ і A β ₉₋₁₇ (див. Таблицю 2). Пептиди також містили C-кінцевий залишок для приєднання KLH. Після 5 ін'єкцій виконували титрування сироваток в "аналізі покриттів" суміші пептидів. Пептиди наносили у вигляді стрептавідин-біотинільованого пептидного комплексу (IGP-2258, див. Таблицю 2) або BSA (бичачий сироватковий альбумін) пептидного комплексу (PG-Nr, див. Таблицю 2) і використовували для детектування антитіла проти антитіла миші, зв'язаного з HRP (Jackson HRP-кон'юговане антитіло кози проти антитіла миші, Cat. No. 115-035-071). Хоча титри були низькими (не показано), першу мишу умертвляли і проводили злиття. Гібридому, що секретує специфічне антитіло, не виділили.

25

Тому набори мишей стимулювали модифікованими пептидами. Трьом мишам вводили суміші вихідних пептидів, двом мишам додатково вводили KLH-злитий пептид IGP-2119 (див. Таблицю 2).

30

Оскільки з суміші п'яти пептидів, пептиди, що відповідають A β ₈₋₁₅, були більш імуногенними, синтезували три додаткові пептиди. Один відповідав A β ₁₋₈, злитому з Т-хелперним епітопом PGPGR (Livingston et al., 2002); IGP-2406 (Таблиця 2) і з C-кінцевим залишком цистеїну для приєднання KLH. Інший пептид також містив інший Т-хелперний епітоп DGDGD (McMillan et al., 1983); IGP-2258 (Таблиця 2). Нарешті, також синтезували розгалужену пептид, що містить C-кінцевий цистеїн для приєднання IGP-2407 (Таблиця 2).

35

Кожний раз двох мишей імунізували новими синтезованими пептидами. Пептид A β ₈₋₁₅ також приєднували до частинок E1 (WO 2004/013172) і використовували для антигенної стимуляції двох останніх мишей. Титри знов перевіряли в "аналізі покриттів" (результати не показані). Титри до A β ₈₋₁₅ в мишах, стимульованих Т-хелперними пептидами і розгалуженим пептидом, дійсно вирости, і було вирішено використовувати всі три миші, що вижили, для злиття. Одна з мишей, стимульована розгалуженим пептидом, померла.

40

Таблиця 2

Послідовність пептидів, що використовуються, і їх реєстраційний номер в Innogenetics

Назва	Рег. номер в Innogenetics	Послідовність
A β ₁₋₈	IGP-2062	D ₁ AEFRHDS ₈ GC
A β ₅₋₁₂	IGP-2121	R ₅ HDSGYEV ₁₂ GC
A β ₆₋₁₃	IGP-2120	H ₆ DSGYEVH ₁₃ GC
A β ₈₋₁₅	IGP-2119	S ₈ GYEVHHQ ₁₅ GC
A β ₉₋₁₆	IGP-2122	G ₉ YEVHHQK ₁₆ GC
A β ₈₋₁₅ DG	IGP-2405	S ₈ GYEVHHQ ₁₅ DGDGDC
A β ₈₋₁₅ PG	IGP-2406	S ₈ GYEVHHQ ₁₅ GPGRGC
A β ₈₋₁₅ розгалужений	IGP-2407	(S ₈ GYEVHHQ ₁₅ DGDGD) ₂ KGC
A β ₈₋₁₅ -біо	IGP-2258	S ₈ GYEVHHQ ₁₅ GK-біотин
A β ₆₋₁₃ -біо	IGP-2259	H ₆ DSGYEVH ₁₃ GK-біотин

Селезінку обох мишей препарували і зливали з клітинами SP2/0. Після посіву проводили скринінг 66 чашок (± 3000 клонів). Під час субклонування обмеженої кількості клонів, 24 були характеризовані з використанням біотинільованих пептидів IGP-2258 і IGP-2259 в аналізі місточкового кон'югування і аналізі Luminex. В аналізі місточкового кон'югування використовували BSA-злитий пептид IGP-128, PG127 (див. Таблицю 3) для твердофазного зв'язування одного зв'язуючого сайту антитіла і для виявлення твердофазно-зв'язаного антитіла в так званому аналізі місточкового кон'югування використовували біотинільований пептид. Даний аналіз показує афінність антитіла: високоафінне антитіло дає більш інтенсивний сигнал в порівнянні з антитілом більш низької афінності. Фактично ідентифікували "два класи" антитіл.

Для визначення специфічності антитіла використовували пептид, зсунутий на два N-кінцеві амінокислотні залишки в порівнянні з $A\beta_{8-15}$ - $A\beta_{6-13}$ пептид. Для ефективної імобілізації вказаних пептидів на гранулах Luminex з авідіном використовували їх біотинільовані варіанти. Після відмивання антитіла детектували антитілом до мишачого антитіла проти фікоеритрину. Результати, представлені в Таблиці 3, являють собою попередні дані, виражені як середня інтенсивність флуоресценції (MFI). Значення нижче за 10 означає значення нижче за фон, таким чином, для всіх антитіл, що тестуються з "низькою афінністю" (OD в аналізі місточкового кон'югування (1) не спостерігали реакції з неспецифічним пептидом (IGP-2259).

Для "антитіла з високою афінністю" на неспецифічний пептид вимірювали слабкий сигнал, але з невеликою відмінністю між антитілами. З "високоафінних" антитіл для субклонування відбирали три антитіла, одне підтипу IgG2b і два IgG1, тоді як з "низькоафінних" антитіл відбирали два антитіла IgG1, з одержанням для повної характеристики п'яти антитіл.

Таблиця 3

Визначення параметрів антитіл, специфічних до N-усіченого 8- $A\beta$, TeiA (усічений амілоїд вісім), під час клонування. Визначали ізотип, реактивність в аналізі кон'югування (висока OD є показником високої афінності) і специфічність в аналізі Luminex з біо-пептидами, імобілізованими на авідінових гранулах. Також вказаний кінцевий субклон, який використовували для подальшого визначення

Клон	Субклон Ig	Аналіз кон'югування (OD450)	Аналіз Luminex (MFI) IGP-2258 IGP-2259		Субклон IGH-		
2.13.E5	IgG2b	4	1686	51	2.13.E5.E4	TeiA2b.6	524
3.46.B10	IgG1	3,7592	1822	24	3.46.B10.E7	TeiA1.1	525
2.6.F4	IgG1				2.6.F4.C2	TeiA1.6	521
1.2.F4		3,5836	1921,5	7			
2.15.A9		3,7124	1628	16			
2.19.C6		2,9978	1707	14			
2.25.H1		4	1503,5	32			
2.28.H4	IgG1	4	1817	23			
2.29.B4	IgG1	3,5506	1717,5	26			
2.46.C10	IgG1	3,0215	1619	13			
3.40.C3		4	1758	20,5			
2.8.A3	IgG1	0,2216	1715	5	2.8.A3F8	TeiA1.7	522
1.3B12	IgG1				1.3.B12.H3	TeiA1.8	523
1.2.G12	IgG1	0,2051	1617	6			
1.3.D12		0,1928					
1.16.B8		0,8537	1616	4			
2.1.G8		0,162	1583	4			
2.28.F5			1632	4			
2.14.C2			1704,5	5			
2.14.D1		0,1441	1642,5	5			
2.24.C4		0,2304	561	3			
2.25.C4		0,8982	1795	5			
2.28.B2	IgG1	0,1478	2451,5	3			
1.3.G12	IgG1						

Приклад 4: Визначення параметрів антитіл, специфічних до N-усіченого амілоїду вісім (TeiA)

Для додаткового підтвердження специфічності вказаних антитіл TeiA до A β використовували два підходи: (1) аналіз в 2D гелі екстракту в мурашиній кислоті мозку людини з хворобою Альцгеймера і (2) суміш "повнорозмірних", синтетичних A β пептидів (Anaspec), відмінних за N-кінцем, що використовуються в методі SELDI (Merchant et al., 2000).

Результати даних підходів показані на Фіг. 6 і 7. Відбір тканини мозку і 2D аналіз виконували практично, як описано Sergeant et al., (2003).

Для визначення положення A β_{42} пептидів, використовували нове антитіло 7G12H1, специфічне до 42-С-кінця (еквівалент 21F12, описаному в Sergeant et al., (2003)). Різні плями характеризували мас-спектрометрією для віднесення до різного N-усікання, як показано на Фіг. 6.)

Приклад 5: MAb TeiA1.6 (A β N-усічений 8) специфічне до паренхіматозних амілоїдних відкладень і не розпізнає судинні амілоїдні відкладення

Один з побічних ефектів пасивної імунізації - це частота мікрокрововиливів. Таке збільшення кількості мікрокрововиливів можна пояснити зв'язуванням антитіл, що вводяться з агрегованими A β пептидами на стінках судин (Paris et al., 2000; Pfeifer et al., Cerebral Hemorrhage After Passive Anti-AB Immunotherapy, Science 15 November 2002; Vol. 298. no.5597, p.1379). Таким чином, усічені A β варіанти являють собою також оригінальні мішені, оскільки вони зазвичай не присутні при амілоїдній ангіопатії. Як показано на Фіг. 8A і 8B, в суміжних відділах мозку AD людини класичне A β антитіло мітить як паренхіматозні, так і судинні амілоїдні відкладення (A, стрілки і кінці стрілок, відповідно, антитіло 6E10).)

При використанні 8 усіченого антитіла (B, тут TeiA1.6), мічення зазнавали тільки паренхіматозні амілоїдні відкладення (B, стрілки), але не судинні амілоїдні відкладення (B, кінці стрілок).

Загалом, наведені дані вказують, що аміно 8-усічені A β антитіла специфічно зв'язують паренхіматозні амілоїдні відкладення і не взаємодіють з судинним амілоїдними відкладенням, які, як передбачають, є відповідальними за периваскулярні ефекти (крововиливи, енцефалопатії) що спостерігаються при інших анти-A β імунних підходах.)

Приклад 6: Внутрішньочерепне введення N-усічених вісім специфічних антитіл (TeiA) трансгенним мишам призводить до зменшення навантаження амілоїдних бляшок

Для демонстрації терапевтичної ефективності антитіл TeiA, їх вводили в гіпокамп трансгенних мишей, що мають амілоїдні бляшки в мозку, і на 7 день після введення кількісно визначали навантаження амілоїдних бляшок в мозку імуногістохімією. Стисло, при стереотаксичних умовах, 1 або 2 мкг антитіла вводили в правий гіпокамп (одностороння ін'єкція) мишам ThyAPP^{SLXPS1_{M146L}} (Blanchard et al., 2003 Exp Neurology 184:247; WO0120977). Введені антитіла являли собою два комерційні класичні A β антитіла (4G8 і 6E10) і TeiA антитіла TeiA 1.1, 1.6, 1.8 і 2b6.)

Через сім днів після ін'єкції тварин піддавали евтаназії, і мозок забирали на імуногістохімію. Після повторної фіксації мозку одержували кріокорональні зрізи (40 мкм) і окремо забарвлювали біотинільованим анти-A β 4G8 як "детектуюче" антитіло 400 мкм відділи мозку для оцінки присутності амілоїдних відкладень в мозку. У випадку якщо 4G8 антитіло вже було введенне в мозок, то для того, щоб уникнути маскування епітопів, як детектуюче антитіло використовували біотинільоване 6E10. Біотинільовані антитіла детектували стандартним набором для авідин-пероксидазного детектування (Vectastain[®] ABC kit Vector Laboratories).

У кожному відділі мозку обчислювали навантаження амілоїдного пептиду в кожній півкулі (ін'єктованій і неін'єктованій) в п'яти різних підобластях мозку [гіпокампи, кортикальні області 1 (тильний), кортикальні області 2 (латеральній), кортикальні області 3 (латеро-вентральній) і таламічній]. Після одержання зображень на скануючій системі Olympus, виконували кількісний підрахунок з використанням напівавтоматичної системи Mercator ExploraNova. Для кожної тварини кількісно аналізували три відділи мозку, розміщені схожим чином відносно точки ін'єкції: один поруч з точкою ін'єкції, один рострально і один кадуально до точки ін'єкції. Як описано раніше (Wilcock et al., 2003, J Neurosci 23:3745; Oddo et al., 2004, Neuron 43:321), ін'єкція 4G8 призводить до істотного зменшення відкладення амілоїдного пептиду в ін'єктованій півкулі в порівнянні з неін'єктованою півкулею (Фіг. 9). Цей ефект варіював залежно від відділу мозку, що можна було очікувати від вказаної локальної ін'єкції антитіла. Антитіло TeiA1.6 також призводило до істотного зменшення амілоїду в мозку, в ін'єктованому боці, що було більш виражено в серії експериментів в кортикальній області 3 (Фіг. 10). Аналіз 4 мишей (у віці 7 місяців) показав на суттєве зменшення (Фіг. 11).

Аналогічно, TeiA1.8 призводив до істотного зменшення амілоїду в мозку, в ін'єктованому боці, що було більш виражено в серії експериментів в кортикальній області 2 (Фіг. 12). Аналіз 4 мишей (у віці 7 місяців) показав на суттєве зменшення (Фіг. 13).

5 Наведені дані демонструють, що антитіла TeiA 1.6 і 1.8 зменшують амілоїдні відкладення в мозку навіть після короткострокового введення, і цілком порівнянні з класичними анти-A β антитілами. Цікаво зазначити, що тварини вже мали значне амілоїдні відкладення під час ін'єкції, що представляє швидше терапевтичний, ніж виключно профілактичний потенціал антитіл TeiA.

10 Таким чином, TeiA антитіла можуть забезпечити хороший терапевтичний ефект проти амілоїдних відкладень у пацієнтів, що страждають хворобою Альцгеймера.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> INNOGENETICS N.V.
 <120> НОВІ АНТИТІЛА, СПЕЦИФІЧНІ ДО β -АМІЛОЇДНИХ ПЕПТИДІВ, І ЇХ
 ЗАСТОСУВАННЯ ЯК ДІАГНОСТИЧНИХ АБО ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
 <130> IOB 07 BE INO MYLO
 <160> 35
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(98)

<400> 1

Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys
1				5					10					15	

Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr
		20						25					30		

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp
		35					40					45			

Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp
65					70					75				80	

Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe
				85					90					95	

Ala Gly

<210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(111)

<400> 2

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Asn
 35 40 45
 Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val
 50 55 60
 Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr His Asp Tyr
 85 90 95
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 3
 <211> . 99
 <212> PRT
 <213> Миша
 <220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(99)

<400> 3

Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Val Asn Tyr Leu Thr
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 35 40 45
 Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe
 85 90 95
 Gly Ala Gly

<210> 4
 <211> 111

<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(111)

<400> 4

Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Thr
1				5				10						15	
Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Phe	Tyr	Met	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Pro
			20					25					30		
Pro	Gly	Arg	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ser	Arg	Asp	Lys	Ala	Lys
		35					40					45			
Asp	Tyr	Thr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Ala	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Ile	Val
	50					55					60				
Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Gln	Ser	Ile	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ala	Leu
65					70					75					80
Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Tyr	Phe	Ser	Tyr
				85					90					95	
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Leu	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			100					105					110		

<210>	5
<211>	99
<212>	PRT
<213>	Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1) .. (99)

<400> 5

Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys
1				5					10					15	
Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Ser	Gln	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr
			20					25					30		
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp
		35					40					45			
Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp
65					70					75					80

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
85 90 95

Gly Ala Gly

<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(110)

<400> 6

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr
1 5 10 15

Ala Gly Phe Thr Phe Thr Asp Gln Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Thr Ile Arg Asn Lys Ala Lys
35 40 45

Gly Phe Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
50 55 60

Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr Leu
65 70 75 80

Arg Ala Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Val Tyr Gly Asn Tyr
85 90 95

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

<210> 7
<211> 99
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(99)

<400> 7

Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
1 5 10 15

Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Arg Gln Thr Asn Tyr Leu Thr
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
35 40 45
Ala Ser Thr Arg Gly Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
65 70 75 80
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe
85 90 95

Gly Ala Gly

<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(110)

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(111)

<400> 8

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr
1 5 10 15
Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Asn
35 40 45
Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val
50 55 60
Ser Arg Asp Thr Ser Gln Gly Ile Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ala Leu
65 70 75 80
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Tyr Arg Tyr Tyr
85 90 95
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 9
<211> 99
<212> PRT
<213> Миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(99)

<400> 9

Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Thr
1 5 10 15

Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Thr Gln Thr Asn Tyr Leu Thr
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
35 40 45

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
65 70 75 80

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe
85 90 95

Gly Ala Gly

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(111)

<400> 10

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr
1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Phe Ile Glu Trp Val Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Thr Ala Ser Arg Asn Lys Asn Tyr
35 40 45

Asp Tyr Lys Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val
50 55 60

Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Tyr Arg His Tyr
85 90 95

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

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(17)

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Gly Arg Tyr Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(8)

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(9)

<400> 13

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Tyr Met Glu
1 5 10

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(19)

<400> 15

Ala Ser Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(8)

<400> 16

Tyr His Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(17)

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Val Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 18

<211> 8

<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(8)

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(9)

<400> 19

Gln Asn Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(8)

<400> 20

Tyr Phe Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(17)

<400> 21

Lys Ser Ser Leu Thr Leu Leu Asn Ser Gly Ser Gln Thr Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(9)

<400> 22

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(10)

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Gln Tyr Met Ser
 1 5 10

<210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(19)

<400> 24

Thr Ile Arg Asn Lys Ala Lys Gly Phe Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(8)

<400> 25

Tyr Gly Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(17)

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Arg Gln Thr Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(7)

<400> 27

Trp Ala Ser Thr Arg Gly Ser
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> миша

<220>
<221> ПЕПТИД
<222> (1)..(10)

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Glu
1 5 10

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> миша

<220>
<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(19)

<400> 29

Ala Ser Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(8)

<400> 30

Tyr Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(17)

<400> 31

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Thr Gln Thr Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> миша

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (1)..(10)

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Phe Ile Glu
1 5 10

<210> 33

<211> 19
 <212> PRT
 <213> миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(19)

<400> 33

Ala Ser Arg Asn Lys Asn Tyr Asp Tyr Lys Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(8)

<400> 34

Tyr Arg His Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> миша

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(19)

<400> 35

Ala Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло, де варіабельна область включає одну з наступних пар амінокислотних послідовностей, які належать, відповідно, до легкого і важкого ланцюга:
 • антитіло TeiA 1.6 (секретоване гібридомою IGН521)
 варіабельна область легкого ланцюга:
 CDR-L1 CDR-L2
- 10 SSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLAGRYQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWAST
 CDR-L3

RDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFAG
(SEQ ID NO: 1),

варіабельна область важкого ланцюга:

CDR-H1 CDR-H2

5 GGLVQPGGSLRLSCAISGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTT
CDR-H3

EYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCATYHDYAMDYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 2),

яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю пептиду $A\beta_{8-x}$, де x складає від 11 до 42, і не
10 впізнає ні $A\beta_{1-40}$, ні $A\beta_{1-42}$.

2. Антитіло за п. 1, де вказане антитіло специфічно направлене на паренхіматозні відкладення
амілоїдного пептиду $A\beta_{8-x}$ в мозку, і не взаємодіє з судинними амілоїдними відкладенням.

3. Антитіло за п. 1 або 2, де x складає від 15 до 42.

4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де CDR варіабельної області легкого і важкого ланцюга
15 включає одну з наступних амінокислотних послідовностей:

• антитіло TeiA 1.6 (послідовність IG521)

CDR варіабельної області легкого ланцюга:

CDR-L1:

KSSQSLLAGRYQKNYLT (SEQ ID NO: 11),

20 CDR-L2:

WASTRDSG (SEQ ID NO: 12),

CDR-L3:

QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 13),

CDR варіабельної області важкого ланцюга:

25 CDR-H1:

GFTFSDFYME (SEQ ID NO: 14),

CDR-H2:

ASRNKANDYTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 15),

CDR-H3

30 YHDYAMDY (SEQ ID NO: 16).

5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, де вказане антитіло помічене сполукою, вибраною з групи,
що включає: радіонуклід, флуоресцентну мітку, ферментну мітку, субстрат ферменту, кофактор
ферменту, інгібітор ферменту і гаптен.

6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке є гуманізованим антитілом.

35 7. Гібридома, яка виробляє антитіло TeiA 1.6, депонована 23 серпня 2007 року в
колекції плазмід BCCM/LMBP під наступними номерами:

TeiA 1.6 або 2.6 F4C2 (IG521) → LMBP 6594CB.

8. Спосіб одержання антитіла за пп. 1-6, яке специфічно зв'язується з N-кінцевою областю
40 пептиду $A\beta_{8-x}$ і не впізнає $A\beta_{1-42}$, де x складає від 11 до 42, переважно 15-42, яке має високу
специфічність, що включає стадію імунізації відповідної тварини пептидом $A\beta_{8-x}$ і Т-хелперним
епітопом, зокрема пептидом $A\beta_{8-x}$, злитим з Т-хелперним епітопом, або $A\beta_{8-x}$ розгалуженим
пептидом, зокрема пептидом $A\beta_{8-15}$, і стадію виділення.

9. Спосіб одержання антитіла за п. 8, де вказане антитіло специфічно зв'язується з N-кінцевою
областю пептиду $A\beta_{8-15}$, не впізнає $A\beta_{1-42}$, і яке виявляє високу афінність відносно пептиду

45 $A\beta_{8-15}$, як визначено за допомогою Вестерн-блотингу.

10. Спосіб визначення *in vitro* амілоїдного навантаження у ссавця, що включає наступні стадії:

(i) кількісне визначення рівня N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ в рідинах тіла вказаного ссавця, із
застосуванням антитіла за будь-яким з пп. 1-6,

50 (ii) порівняння рівня антитіла вказаного ссавця з рівнем антитіла, одержаним у контрольного
ссавця, і

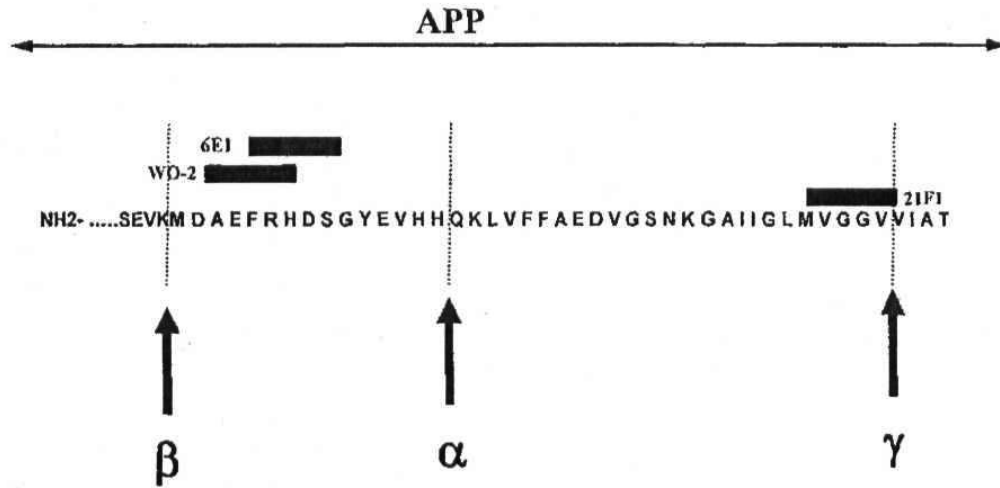
(iii) визначення зі стадії (ii), чи страждає вказаний ссавець неврологічним захворюванням, за
умови, що рівень N-кінцевого усіченого $A\beta_{8-x}$ змінений відносно рівня, виміряного у контрольного
ссавця, і, зокрема, є більш високим, ніж рівень, виміряний у контрольного ссавця.

11. Спосіб за п. 10, де ссавець є людиною.

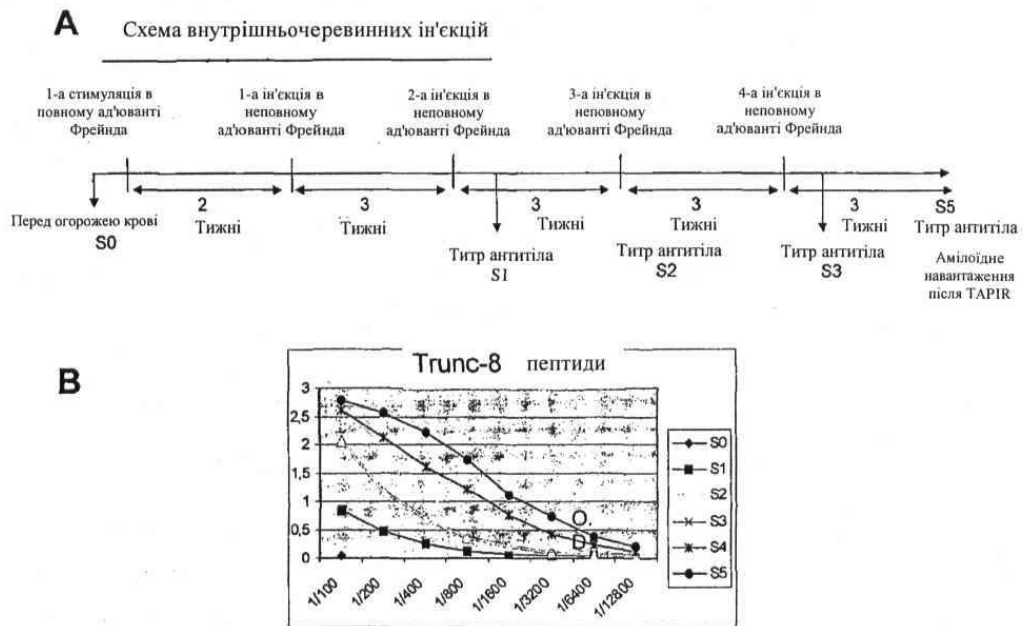
55 12. Спосіб за п. 10 або 11, де специфічність і чутливість вказаного антитіла до $A\beta_{8-42}$ перевищує
63 %, переважно складає від приблизно 63 % до приблизно 100 %, більш переважно складає
від приблизно 75 % до 85 % і більш переважно складає від 85 % до 100 %.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 10-12, де вказана рідина тіла є спинномозковою рідиною (СМР)
або кров'ю.

14. Спосіб визначення сприйнятливості ссавця до захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, такого як хвороба Альцгеймера, для визначення у ссавця ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, такого як хвороба Альцгеймера, для скринінгу у ссавця усунення β -амілоїдного відкладення або прогнозування у ссавця рівня β -амілоїдного навантаження, де вказаний спосіб включає наступні стадії:
 - (i) визначення у вказаного ссавця кількості пептиду $A\beta_{8-x}$ із застосуванням антитіла за будь-яким з пп. 1-6,
 - (ii) порівняння визначеної на стадії (i) кількості з кількістю антитіла, специфічного до вказаної N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$ у контрольного ссавця, і
 - (iii) висновок з порівняння на стадії (ii), чи є ссавець сприйнятливим до захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, такого як хвороба Альцгеймера, чи зазнає ссавець ризику розвитку захворювання, пов'язаного з утворенням і/або агрегацією β -амілоїду, такого як хвороба Альцгеймера, чи усунене β -амілоїдне відкладення у ссавця, або яким є рівень β -амілоїду у вказаного ссавця.
15. Спосіб за п. 14, де кількість антитіла, специфічного до N-кінцевої області пептиду $A\beta_{8-x}$, визначають у зразку тканини, одержаної від вказаного ссавця.
16. Набір, що включає щонайменше один буфер і щонайменше одну сполуку для детекції, щонайменше одне специфічне антитіло до N-усіченого $A\beta_{8-x}$ за будь-яким з пп. 1-6.
17. Набір за п. 16, що додатково включає переважно мічене вторинне антитіло, яке зв'язується з антитілом за будь-яким з пп. 1-6.
18. Терапевтична композиція, що включає як активний компонент антитіло за будь-яким з пп. 1-6 або що включає синтетичні N-кінцеві пептиди з вільним N-кінцем, що імітує вільний N-кінець N-усічених $A\beta$ пептидів, разом з фармацевтично прийнятним носієм.
19. Терапевтична композиція за п. 18, придатна для введення людині дози антитіла від 1 мг/кг/день до 200 мг/кг/день.
20. Вакцинна композиція, що включає як активний компонент антитіло за будь-яким з пп. 1-6, його фрагменти або похідні або що включає синтетичні N-кінцеві пептиди з вільним N-кінцем, що імітує вільний N-кінець N-усічених $A\beta$ пептидів, разом з фармацевтично прийнятним носієм.
21. Вакцинна композиція за п. 20, придатна для введення людині дози антитіла від 1 мг/кг/день до 200 мг/кг/день.
22. Застосування щонайменше одного антитіла за будь-яким з пп. 1-6 для одержання лікарського засобу або вакцини, призначених для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера.
23. Застосування щонайменше одного антитіла за будь-яким з пп. 1-6 для одержання лікарського засобу або вакцини, призначених для усунення β -амілоїдного навантаження.
24. Спосіб усунення β -амілоїдного навантаження у ссавця, що включає введення композиції за пп. 18-21 вказаному ссавцеві.
25. Застосування терапевтичної композиції або вакцини за п. 18 або 20 для індукування імунної відповіді у ссавця, страждаючого або сприйнятливого до розвитку хвороби Альцгеймера.



Фіг. 1

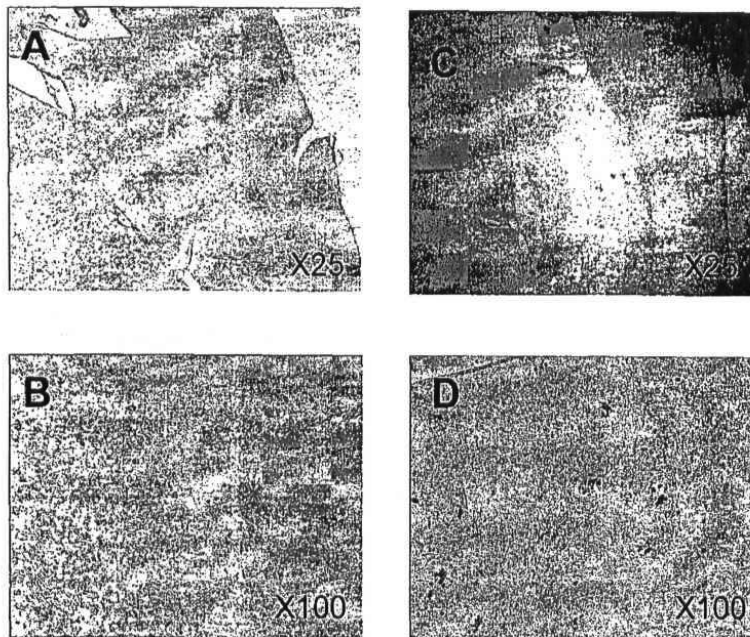


Фіг. 2

TAPIR

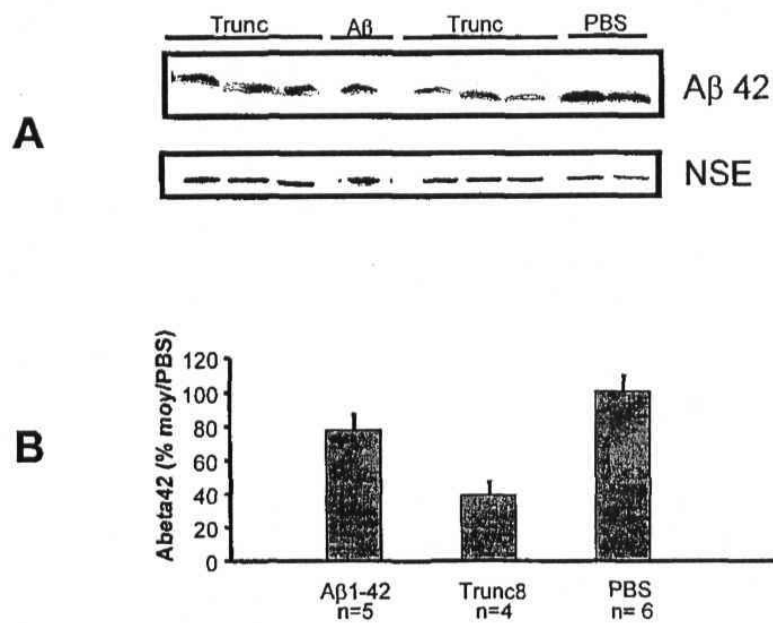
Сироватка миші нереспондера

TruncS im. сироватка миші



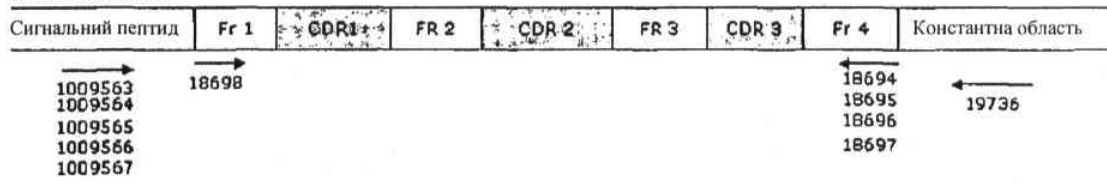
Фіг. 3

Екстракт мозку в мурашиній кислоті, ДСН-ПААГ, Вестерн блоттинг 21P12



Фіг. 4

Легкий ланцюг



Важкий ланцюг

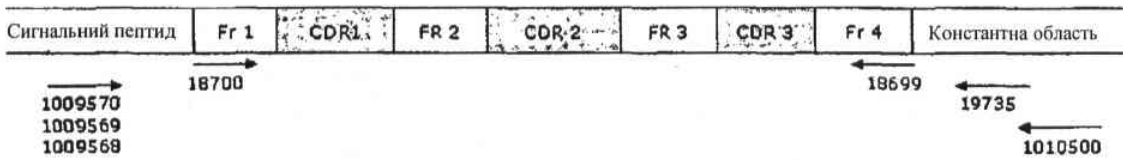


Fig. 5

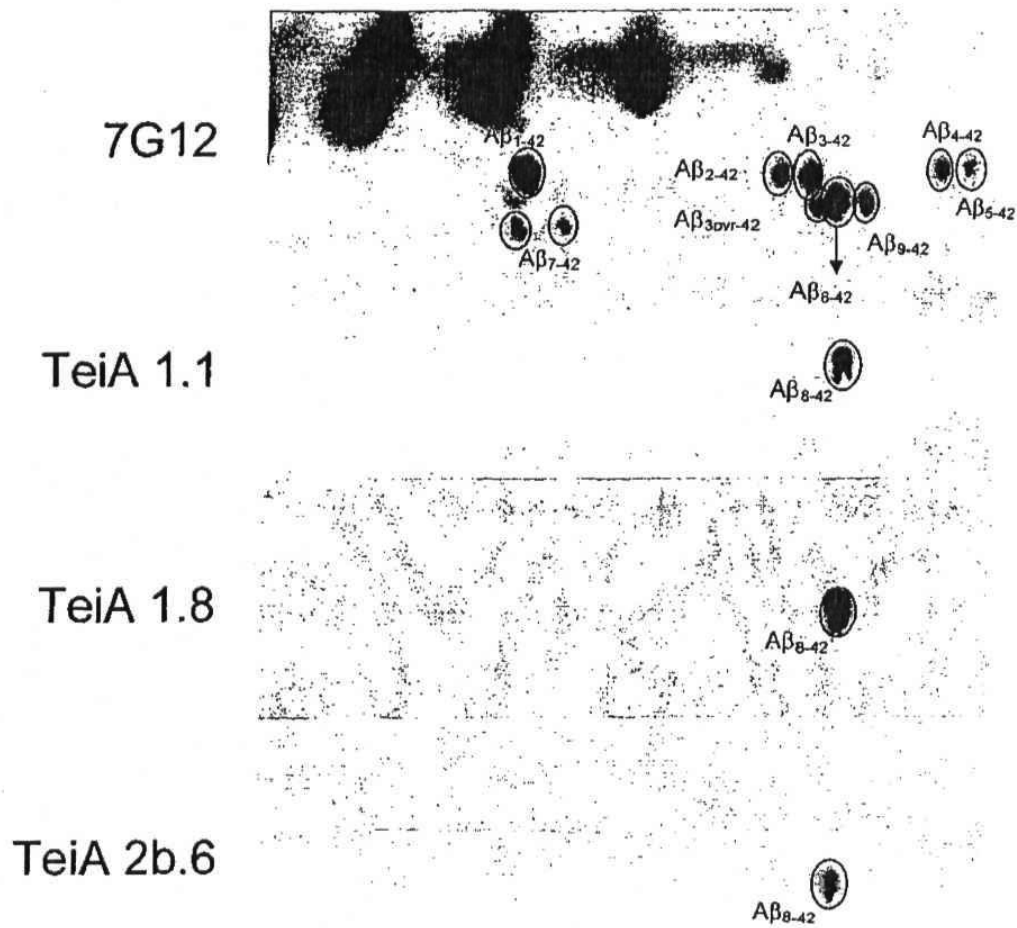


Fig. 6

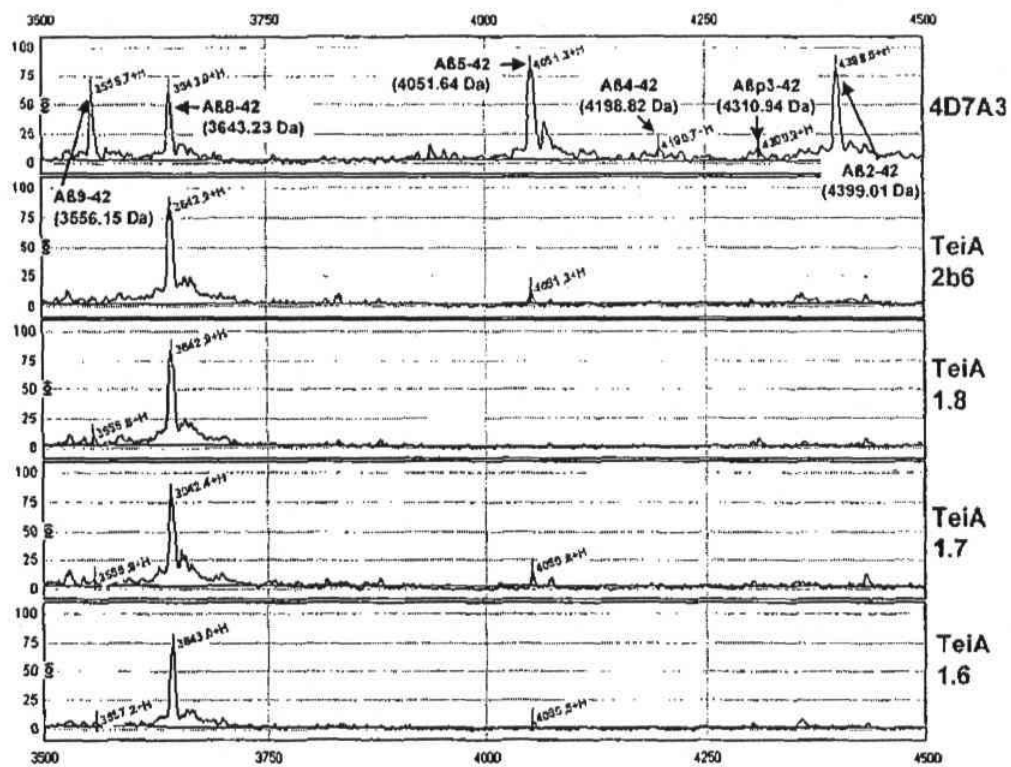


Fig. 7

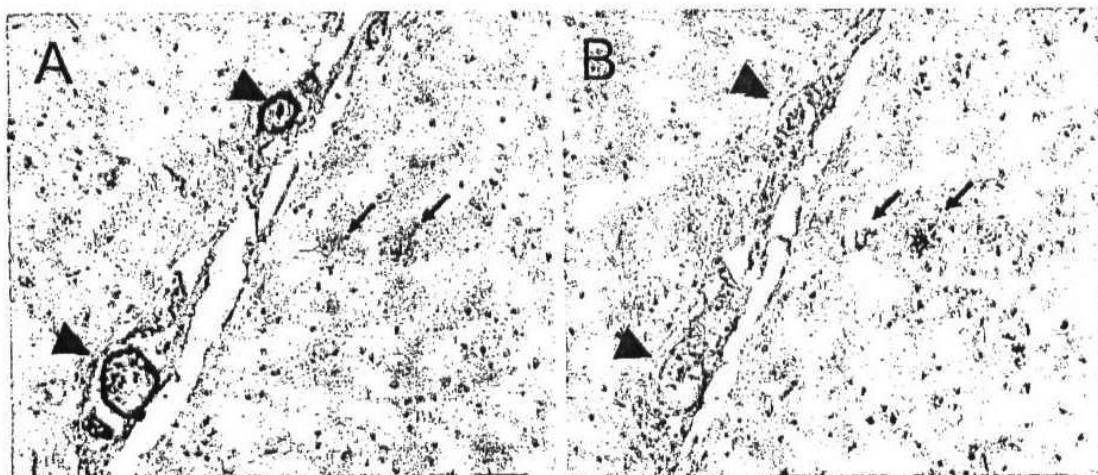
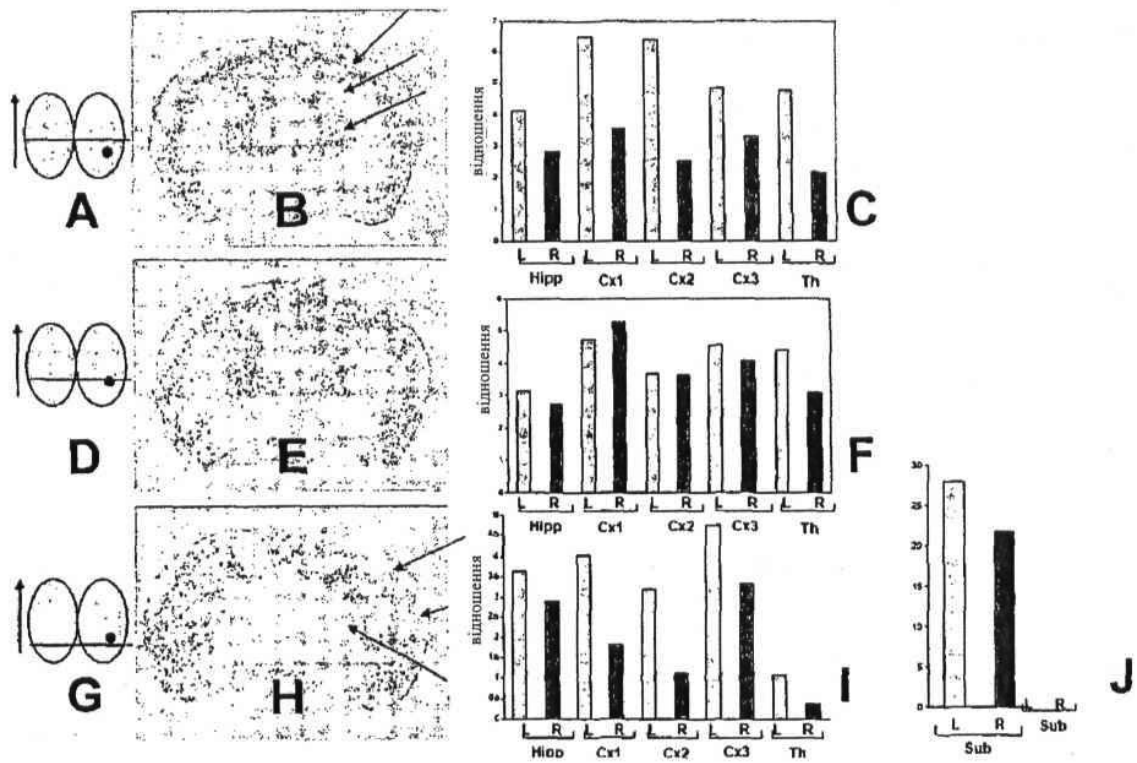
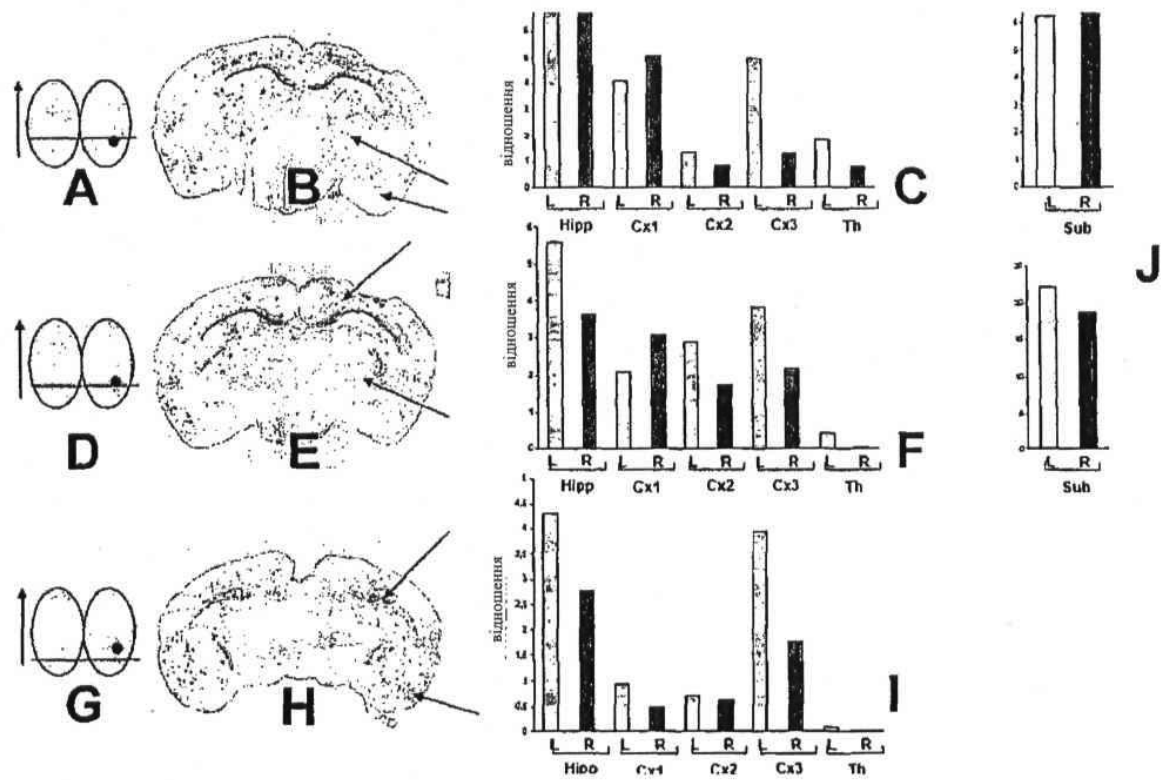


Fig. 8

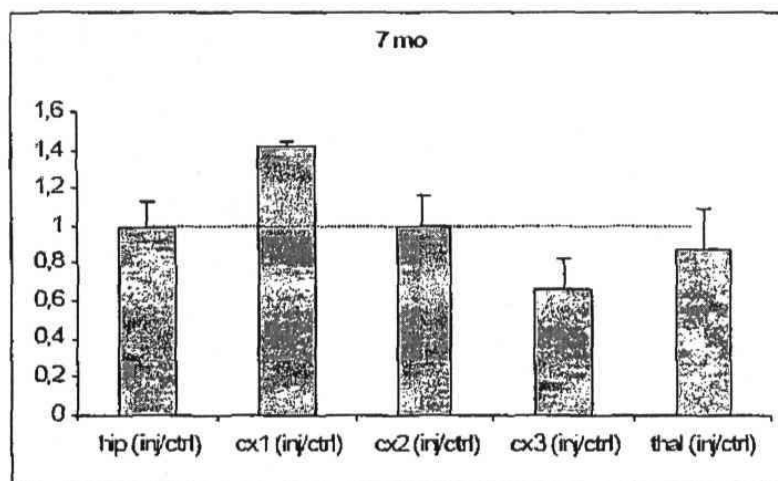


Фіг. 9

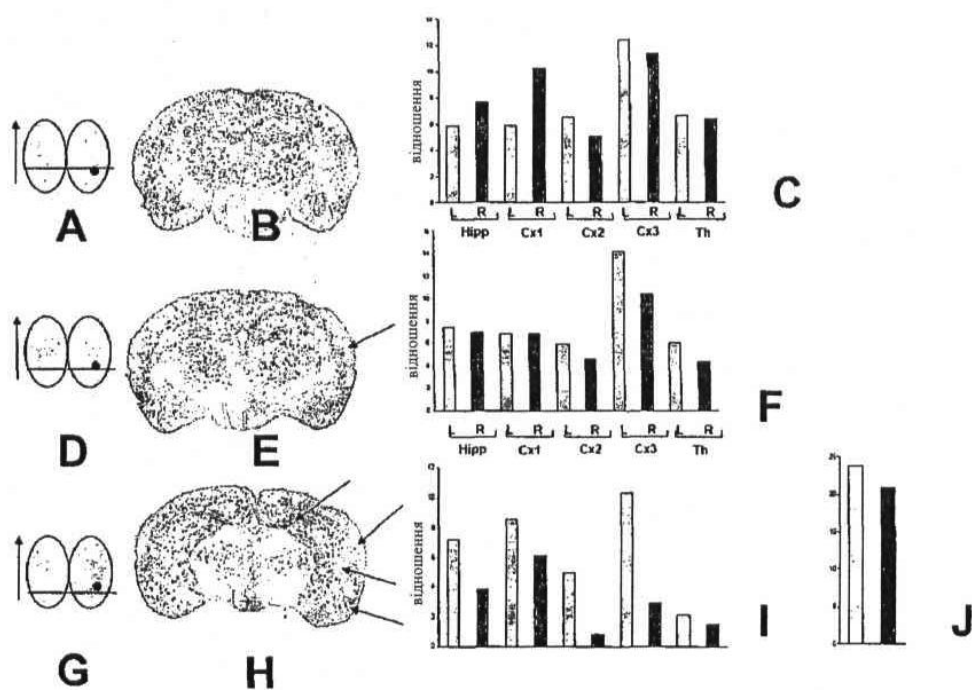


Фиг. 10

Відношення амплітудної напруги в ін'єктованому боці мозку
і неін'єктованому боці мозку

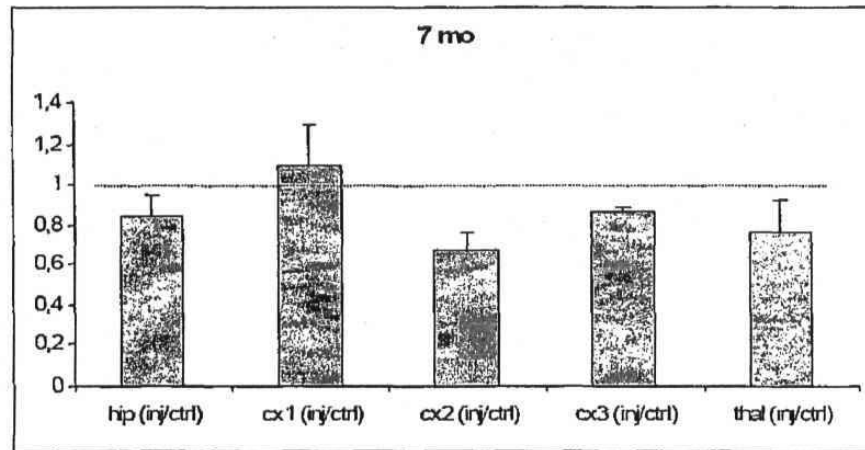


Фіг. 11



Фіг. 12

Відношення амплітудної навантажки в ін'єктованому боці мозку
і неін'єктованому боці мозку



Фіг. 13

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601