

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 102368 (13) C2**
(51) МПК**A61K 39/395 (2006.01)****C07K 16/18 (2006.01)****G01N 33/577 (2006.01)****ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2008 08792	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	08.12.2006	US2003108551 A1, 12.06.2003.
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.07.2013	WO0118169 A, 15.03.2001.
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	05027092.5, 06014729.5, 06020766.9	WO2005105998 A, 10.11.2005.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12.12.2005, 14.07.2006, 02.10.2006	WO2004071408 A, 26.08.2004.
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, EP, EP	US2004043418 A1, 04.03.2004.
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.10.2008, Бюл.№ 19	WO9640731 A, 19.09.1996.
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.07.2013, Бюл.№ 13	LIU RUITIAN ET AL: "Single chain variable fragments against beta-amyloid (Abeta) can inhibit Abeta aggregation and prevent Abeta-induced neurotoxicity" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 43, no. 22, 12 May 2004 (2004-05-12), pages 6959-6967.
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2006/011862, 08.12.2006	SOLOMON B ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT IN VITRO FIBRILLAR AGGREGATION OF THE ALZHEIMER BETA-AMYLOID PEPTIDE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, January 1996 (1996-01), pages 452-455.
(72) Винахідник(и): Греферат Рут (DE), Хікман Девід (GB/DE), Мус Андреас (DE/CH), Пфайфер Андреа (DE/CH), Ніколя Клод (FR/US)		DATABASE EMBL [Online] 16 July 1988 (1988-07-16), "Mouse immunoglobulin rearranged kappa-chain V-region V105 gene from C.AL20-TEPC-105 myeloma, exons 1 and 2." XP002429773 retrieved from EBI accession no. EMBL:M12183 Database accession no. M12183.
(73) Власник(и): АС ІММУНЕ С.А., EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne, Switzerland (CH)		DATABASE Geneseq [Online] 15 April 1998 (1998-04-15), "L chain subunit of Fas specific antibody coding sequence." XP002431264 retrieved from EBI accession no. GSN:AAT88870 Database accession no. AAT88870.
(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115		DATABASE EMBL [Online] 8 February 1999 (1999-02-08), "Mus musculus F5.20G3 low-affinity anti-phosphorylcholine IgG antibody mRNA, partial cds." XP002429775 retrieved from EBI accession no. EMBL:AF044238 Database accession no. AF044238.
		DATABASE Geneseq [Online] 22 April 2003 (2003-04-22), "Mouse DNA encoding antibody 3D8 heavy chain variable region." XP002429776 retrieved from EBI accession no. GSN:ABX16569 Database accession no. ABX16569.

UA 102368 C2

(54) СПЕЦИФІЧНІ У ВІДНОШЕННІ β -АМІЛОЇДУ 1-42 МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА, ЯКІ МАЮТЬ ТЕРАПЕВТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

(57) Реферат:

Винахід належить до антитіла, що розпізнає і зв'язується з епітопом β -амілоїдного білка; способу одержання зазначеного антитіла; застосування зазначеного антитіла для лікування або полегшення протікання амілоїдозу, групи захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і пов'язаний з віком амілоїдоз, включаючи неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера; до композицій, що містять згадане антитіло, призначених для терапевтичного й діагностичного застосування при лікуванні зазначених захворювань; до тест-набору, що містить зазначене антитіло.

Даний винахід стосується способів і композицій, призначених для терапевтичного й діагностичного застосування при лікуванні захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу порушень і патологій, асоційованих з амілоїдним білком, таких як хвороба Альцгеймера.

Амілоїдоз являє собою не окреме захворювання, а скоріше групу різноманітних прогресуючих хворобливих процесів, які характеризуються позаклітинними відкладеннями в тканині воскоподібного крохмалеподібного білка, який називається амілоїдом, що накопичується в одному або декількох органах або системах організму. Після утворення амілоїдних відкладень вони починають перешкоджати нормальному функціонуванню органа або системи організму. Існує принаймні 15 різних типів амілоїдозу. Основними формами є первинний амілоїдоз, що не має відомих провісників (станів-попередників) захворювання, вторинний амілоїдоз, що виникає після певного іншого стану, і спадковий амілоїдоз.

Вторинний амілоїдоз виникає в людей, що страждають від хронічних інфекційних або запальних захворювань, таких як туберкульоз, бактеріальна інфекція, яку називають сімейною середземноморською лихоманкою, кістковими інфекційні захворювання (остеомієліт), ревматоїдний артрит, запалення тонкого кишечника (гранулематозний ілеїт), хвороба Ходжкіна і лепра.

Амілоїдні відкладення, як правило, включають три компоненти. Амілоїдні білкові фібрили, на частку яких припадає приблизно 90 % амілоїдного матеріалу, складаються з одного або декількох різних типів білків. Фібрили цих білків мають здатність приймати так звану "бета-складчасту конформацію", що представляє собою унікальну конфігурацію білка, що має сайти зв'язування з барвником конго червоним, що обумовлює унікальну здатність амілоїдного білка до фарбування. Крім того, амілоїдні відкладення тісно асоційовані з компонентом, що представляє собою амілоїд Р (пентагональний) (AP), глікопротеїн, споріднений до звичайного сироваткового амілоїду Р (амілоїдного білка) (SAP), і сульфатованими глікозаміногліканами (GAG), складними вуглеводами, які є присутні у сполучній тканині.

Багато захворювань, зв'язаних з віком, обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками й характеризуються, зокрема, утворенням позаклітинних відкладень амілоїду або амілоїдоподібного матеріалу, які беруть участь у патогенезі, а також у розвитку захворювання. Такі захворювання включають (але не обмежуючись ними) неврологічні порушення, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона. Інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, являє собою прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з BIL деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Хоча патогенез цих захворювань може бути різним, характерні для них відкладення часто містять багато подібних молекулярних компонентів. У значній мірі це може стосуватися місцевої активації прозапальних шляхів, приводячи тим самим до конкурентного відкладення компонентів активованого комплексу, реактантів гострої фази, імуномодуляторів і інших запальних медіаторів (McGeer і ін., 1994).

Хвороба Альцгеймера (AD) являє собою неврологічне порушення, яке, як передбачається, викликається насамперед амілоїдними бляшками, нагромадженням патологічних відкладень білків у головному мозку. Тип амілоїду, який найчастіше зустрічається і який виявлений у головному мозку уражених захворюванням індивідуумів, в основному складається з Аβ-фібрил. Науково доведено, що збільшення виробництва й нагромадження бета-амілоїдного білка в бляшках приводить до загибелі нервових клітин, що сприяє виникненню й розвитку хвороби Альцгеймера. У свою чергу, втрата нервових клітин у стратегічно важливих ділянках головного мозку приводить до зменшення рівня нейромедіаторів і погіршення пам'яті. До білків, які в першу чергу відповідають за утворення бляшки, належать амілоїдний білок-попередник (APP) і два пресеніліни (пресенілін I і пресенілін II). Послідовне розщеплення амілоїдного білка-попередника (APP), що конститутивно експресується й катаболізується в більшості клітин, ферментами β- і γ-секретазами приводить до вивільнення Аβ-пептиду, який складається з 39-43 амінокислот. Розщеплення APP, очевидно, приводить до підвищення їх здатності до агрегації з утворенням бляшок. Аβ(1-42)-фрагмент має насамперед найбільш високу здатність утворювати агрегати завдяки наявності двох високогідрофобних амінокислотних залишків на його С-кінці. Тому передбачається, що насамперед Аβ(1-42)-фрагмент бере участь і відповідає за ініціацію

утворення нейритної бляшки при хворобі Альцгеймера й отже має високий патологічний потенціал. Таким чином, існує необхідність у створенні специфічних антитіл, які можуть направлено впливати на утворення амілоїдних бляшок і руйнувати їх.

Симптоми AD проявляються повільно, і першим симптомом може бути лише слабка забудькуватість. На цій стадії індивідууми можуть забувати останні події, дії, імена знайомих людей або назви речей і можуть бути не в змозі вирішити прості математичні завдання. При прогресуванні хвороби симптоми стають більш помітними й настільки серйозними, що змушують людей, уражених AD, або членів їх родини вдаватися до медичної допомоги. Симптоми, характерні для середньої стадії AD, включають забування того, як виконувати прості функції, такі як доглядати за собою, при цьому виникають проблеми з мовою, розумінням, читанням або письмом. Пацієнти на пізній стадії AD можуть ставати боязкими або агресивними, можуть іти далеко від дому й, зрештою, потребувати повного догляду.

Зараз єдиним надійним шляхом діагностики AD є ідентифікація бляшок і сплеть у тканині головного мозку при розтині після смерті індивідуума. Таким чином, поки індивідуум ще живий, лікарі можуть ставити тільки діагноз "можлива" або "імовірна" AD. За допомогою сучасних методів лікарі можуть правильно діагностувати аж до 90 відсотків випадків AD за допомогою ряду засобів, що дозволяють діагностувати "можливу" AD. Лікарі задають питання про загальний стан здоров'я індивідуума, медичні проблеми, що мали місце в минулому, і історії яких-небудь утруднень в індивідуума при виконанні повсякденних дій. Поведінкові тести на пам'ять, вирішення завдань, увагу, лічбу і мову дозволяють одержувати інформацію про когнітивну дегенерацію, а медичні аналізи, такі як аналізи крові, сечі або спинномозкової рідини, і сканування головного мозку можуть дати деяку додаткову інформацію.

Боротьба з AD полягає в здійсненні лікування, заснованого на застосуванні лікарських засобів, і лікування без використання лікарських засобів (немедикаментозного лікування). Лікування з метою зміни основного перебігу хвороби (уповільнення або реверсування розвитку) дотепер були в основному безуспішними. Було продемонстровано, що лікарські засоби, які відновлюють дефіцит (дефект) або недостатню функцію хімічних медіаторів нервових клітин (нейромедіаторів), зокрема, інгібітори холінерастери (ChEI), такі як такрин і ривастигмін, дозволяють поліпшувати симптоми. ChEI затримують ферментативне розщеплення нейромедіаторів, підвищуючи тим самим кількість хімічних медіаторів, придатних для передачі нервових сигналів у головному мозку.

Для деяких людей на ранній і середній стадіях захворювання такі лікарські засоби, як такрин (COGNEX[®], Моррис-Плейнс, шт. Нью-Джерсі), донепезил (ARICEPT[®], Токіо, Японія), ривастигмін (EXELON[®], Іст-Хановер, шт. Нью-Джерсі) або галантамін (REMINYL[®], Нью-Брансуїк, шт. Нью-Джерсі), можуть попереджати погіршення деяких симптомів протягом обмеженого періоду часу. Інший лікарський засіб, мемантин (NAMENDA[®], Нью-Йорк, шт. Нью-Йорк), дозволено для лікування AD від середньої до важкого ступеня. Лікарські засоби можуть впливати також на психіатричні прояви AD. Деякі лікарські засоби можуть допомагати також контролювати поведінкові симптоми AD, такі як безсоння, збудження, блукання, тривога й депресія. Лікування цих симптомів часто робить життя пацієнтів більш комфортним й полегшує обслуговуючому персоналу догляд за ними. На жаль, незважаючи на значні успіхи лікування, які демонструють, що цей клас агентів істотно перевершує за ефективністю плацебо, хвороба продовжує прогресувати, а вплив на розумові функції в середньому є дуже обмеженим. Багато лікарських засобів, застосовуваних для лікування AD, такі, наприклад, як ChEI, мають також побічні дії, які включають шлунково-кишкові порушення, токсичність для печінки й втрату ваги.

До інших захворювань, які обумовлені або асоційовані з нагромадженням і відкладенням амілоїдоподібного білка, належать помірне когнітивне порушення, деменція, зв'язана з тільцями Леві (LBD), аміотрофічний боковий склероз (ALS), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), і дегенерація жовтої плями, насамперед зв'язана з віком дегенерація жовтої плями (AMD).

Помірне когнітивне порушення (MCI) є загальним поняттям, що включає порушення пам'яті, які найчастіше зустрічаються і які є невеликими, але помітними. Індивідуум, що страждає від MCI, відчуває більше утруднень, зв'язаних з пам'яттю, ніж це можна очікувати у зв'язку з віком, однак не має інших симптомів деменції, таких як порушення розсудливості й логічного ходу думки. MCI являє собою стан, який часто є свідченням передклінічної стадії AD.

Відкладення β -амілоїду в енторинальній ділянці кори головного мозку (EC), очевидно, відіграє основну роль у розвитку помірного когнітивного порушення (MCI) у старому віці. Це узгоджується з даними про те, що рівні $A\beta(1-42)$ в CSF (спинномозкова рідини)-A істотно знижуються, коли клінічні ознаки AD стають явними. На відміну від CSF-A, рівні $A\beta(1-42)$ в CSF-тау істотно підвищуються на стадії MCI, і ці рівні продовжують залишатися підвищеними надалі,

це свідчить про те, що підвищені рівні в CSF-тау можна використовувати для виявлення індивідуумів, що страждають від MCI, які схильні до розвитку AD.

Деменція, зв'язана з тільцями Леві (LBD), являє собою нейродегенеративне порушення, яке може виникати в індивідуумів старше 65 років, як правило, що викликає симптоми когнітивного (розумового) порушення й патологічні зміни поведінки. Симптоми можуть включати когнітивне порушення, неврологічні ознаки, порушення сну й нездатність до самостійних дій. Когнітивне порушення в більшості випадків є характерною рисою LBD. У пацієнтів відбуваються повторювані випадки замішання, які прогресивно збільшуються. Флуктуації когнітивної здатності часто асоційовані із зсувом рівня уваги й пильності. Когнітивне порушення й флуктуації розумової здібності можуть змінюватися протягом хвилин, годин або днів.

Тільця Леві утворюються з фосфорилованих і нефосфорилованих нейрофіламентних білків; вони містять синаптичний білок альфа-синуклеїн, а також убіквітин, що бере участь в елімінації ушкоджених або аномальних білків. Крім тілець Леві можуть бути присутні також нейрити Леві, що представляють собою тільця включення, що беруть участь у клітинних процесах у нервових клітинах. Амілоїдні бляшки можуть утворюватися в головному мозку пацієнтів, уражених LBD, однак, як правило, у меншій кількості, ніж у пацієнтів, що страждають від хвороби Альцгеймера. Наявність нейрофібрилярних сплетень, що представляють собою ще одну мікропатологічну ознаку AD, не є головною відмінною рисою LBD, але вони часто присутні додатково до амілоїдних бляшок.

Аміотрофічний боковий склероз (ALS) характеризується дегенерацією верхніх і нижніх рухових нейронів. У деяких пацієнтів з ALS може мати місце деменція або афазія (ALS-D). Деменція найчастіше являє собою лобово-скроневу деменцію (FTD), і в багатьох таких випадках є убіквітин-позитивні, тау-негативні включення в нейронах зубчастої звивини медіальної й нижньої поверхні півкулі головного мозку й поверхневих шарів лобової й скроневої долі головного мозку.

Міозит, зв'язаний з тільцями включення (IBM), являє собою інвалідизуюче захворювання, яке, як правило, виявляється в людей старше 50 років, при якому виникає запалення м'язових волокон, і вони починають атрофуватися, але при цьому головний мозок не уражається, і пацієнти повністю зберігають свій інтелект. Виявлено, що рівень двох ферментів, що беруть участь у виробництві білка амілоїду- β , підвищений у м'язових клітинах пацієнтів, які страждають від цього прогресуючого м'язового захворювання, що часто зустрічається в людей похилого віку, при цьому підвищується також рівень амілоїду- β .

Ще одним захворюванням, обумовленим або асоційованим з нагромадженням і відкладенням амілоїдоподібного білка, є дегенерація жовтої плями.

Дегенерація жовтої плями являє собою звичайне захворювання ока, що викликає деградацію жовтої плями, тобто центральної ділянки сітківки (тонкий шар тканини на задній частині ока, звідки світлочутливі клітини посилюють зорові сигнали в головний мозок). Жовта пляма опосередковує гострий, чіткий, "неспопсаний" зір. Ушкодження жовтої плями приводить до розвитку сліпих плям і затуманеного або порушеного зору. Зв'язана з віком дегенерація жовтої плями (AMD) є основною причиною погіршення зору в Сполучених Штатах, і в людей старше 65 років вона являє собою основну причину медично підтвердженої сліпоти серед осіб кавказької раси. Приблизно 1,8 мільйонів американців у віці 40 років і більше мають розвинену AMD, а ще в 7,3 мільйонів людей з помірною AMD є значний ризик втрати зору. За оцінками уряду до 2020 р. 2,9 мільйони людей будуть мати розвинену AMD. Жертви AMD часто бувають здивовані й розстроєні, коли довідаються, як мало відомо про причини й методи лікування цього стану сліпоти.

Існує дві форми дегенерації жовтої плями: суха дегенерація жовтої плями й волога дегенерація жовтої плями. Суха форма, при якій клітини жовтої плями повільно починають руйнуватися, діагностована в 85 відсотків випадків дегенерації жовтої плями. Як правило, суха AMD вражає обидва ока, хоча при цьому одне око може втратити зір, а друге око залишатися неураженим. Звичайно ранніми ознаками сухої AMD є друзи, які являють собою відкладення жовтого тіла під сітківкою. Ризик виникнення розвинутої сухої AMD або вологої AMD підвищується зі збільшенням кількості або розміру друз. Суха AMD може прогресувати й викликати втрату зору, не перетворюючись у вологу форму захворювання; однак на ранній стадії суха AMD може раптово переходити у вологу форму.

Хоча на частку вологої форми припадає тільки 15 відсотків випадків, вона в 90 відсотках приводить до сліпоти, і її розглядають як розвинену AMD (не існує ранньої або проміжної стадії вологої AMD). Вологій AMD завжди передують суха форма захворювання. При прогресуванні сухої форми в деяких людей починається патологічний ріст кровоносних судин за жовтою плямою. Ці судини є дуже тендітними й з них просочується рідина й кров (звідси назва "волога" дегенерація

жовтої плями), приводячи до швидкого ушкодження жовтої плями.

Суша форма AMD спочатку часто викликає злегка затуманений зір. Потім насамперед центральна частина зорового поля може ставати затуманеною, і ця ділянка збільшується в розмірах при прогресуванні захворювання. Якщо уражене лише одне око, то симптоми можуть залишатися непоміченими. У випадку вологої AMD прямі лінії можуть здаватися хвилястими й при цьому може швидко наступати втрата центрального зору.

Для встановлення діагнозу дегенерації жовтої плями, як правило, проводять дослідження розширеного ока (зіниці), тест на гостроту зору й обстеження задньої стінки ока з використанням процедури, яку називають фундоскопією, що допомагає встановленню діагнозу AMD, і, якщо є припущення про наявність вологої AMD, то може бути проведена ангиографія з використанням флуоресцеїну. Зараз відсутні засоби лікування, що дозволяють попереджати втрату зору, якщо суша AMD досягла розвинутої стадії. Однак застосування певної композиції, яка містить високу дозу антиоксидантів і цинку, може сповільнювати або попереджати прогресування проміжної стадії AMD, що приводить до переходу в розвинену стадію. Mасigen® (ін'єкція пегалтанібу натрію), лазерне фотокоагулювання й фотодинамічна терапія дозволяють контролювати патологічний ріст кровоносних судин і крововилив у жовтій плямі, що є корисним для певної групи людей з вологою AMD; однак зір, якщо він вже майже втрачений, не може бути відновлений за допомогою таких методів. Якщо зір майже втрачений, то існують засоби для слабкого зору, які можуть допомогти поліпшити якість життя.

Однією з найбільш ранніх ознак зв'язаної з віком дегенерації жовтої плями (AMD) є нагромадження позаклітинних відкладень, відомих як друзи, в ділянці, що знаходиться між базальним шаром пігментованого епітелію сітківки (RPE) і базальною оболонкою Бруха (BM). Результати сучасних досліджень, проведених Anderson зі співавторами, підтвердили, що друзи містять амілоїд-бета (Experimental Eye Research 78, 2004, стор. 243-256).

Зараз проводяться дослідження, у яких вивчають фактори навколишнього середовища, генетичні й зв'язані з харчуванням фактори, які можуть впливати на AMD. Досліджують також нові стратегії лікування, включаючи застосування трансплантатів клітин сітківки, лікарських засобів, які повинні попереджати або сповільнювати прогресування захворювання, променевої терапії, генної терапії, комп'ютерного чіпа, імплантованого в сітківку, що може стимулювати зір, і агентів, які повинні попереджати ріст нових кровоносних судин під жовтою плямою.

Важливим фактором, який необхідно враховувати при розробці нових лікарських засобів, є простота їх застосування пацієнтами, для яких вони призначені. На частку лікарських засобів, які вводять пероральним шляхом, зокрема, таблеток, капсул і м'яких гелів, припадає 70 % всіх застосовуваних лікарських форм через зручність їх застосування пацієнтами. Розробники лікарських засобів визнають, що пацієнти надають перевагу пероральному застосуванню в порівнянні з ін'єкціями, або іншими більш інвазивними формами, які застосовують в медицині. Також переважними є препаративні форми, які дозволяють знижувати кількість доз (тобто форми, які застосовують один раз на день, або форми із пролонгованим вивільненням). Простота застосування антибіотиків у вигляді пероральних лікарських форм приводить до того, що дотримання пацієнтом режиму й схеми лікування в процесі лікування поліпшується.

Існує необхідність у створенні ефективних методів і композицій для одержання високоспецифічних і високоефективних антитіл, передумовою для створення яких є можливість застосування антитіл в пероральній лікарській формі. Переважно такі антитіла повинні розпізнавати специфічні епітопи на різних антигенах, таких як амілоїдний білок.

Таким чином, необхідна розробка ефективних композицій і методів, спрямованих на боротьбу з ускладненнями, асоційованими із хворобами й порушеннями, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями. Зокрема, існує необхідність у розробці спеціалізованих і високоефективних антитіл, які дозволяють протидіяти фізіологічним проявам захворювання,

таким як утворення бляшок, асоційоване з агрегацією волокон амілоїду або амілоїдоподібного пептиду.

Було встановлено, що антитіла до амілоїдів, які виробляються при інокуляції A β 1-42, змішаним з повним або неповним ад'ювантом Фрейнда, мають здатність знижувати амілоїдну навантаження в трансгенних мишей, на яких змодельована людська хвороба Альцгеймера (Schenk і ін., 1999).

Внутрішньоочеревинна інокуляція тетрапальмітоїлованого A β 1-16, реконструйованого в ліпосомах, трансгенним мишам лінії NORBA приводила до одержання високих титрів антитіл до амілоїдів, які мали також здатність солюбілізувати амілоїдні волокна й бляшки *in vitro* і *in vivo* (Nicolau і ін., 2002).

Уперше гіпотеза про можливий механізм, за допомогою якого відбувається розчинення амілоїдних бляшок і волокон, була запропонована Bard зі співавторами, 2000, які ґрунтувалися на власних результатах про те, що антитіла опсонізують бляшки, які потім руйнуються макрофагами мікроглії. De Mattos зі співавторами, 2001 встановили, що МАТ до центрального домену β -амілоїду мало здатність зв'язуватися й повністю руйнувати амілоїд у плазмі. Вони довели, що присутність вказаних МАТ у кровотоці зсувало рівновагу А β між головним мозком і плазмою у сторону периферичного кліренсу й катаболізму замість нагромадження в головному мозку.

У даному винаході запропоновані нові способи й композиції, яка містять високоспецифічні й високоефективні антитіла, які мають здатність специфічно розпізнавати й зв'язуватися зі специфічними епітопами, характерними для широкої різноманітності β -амілоїдних антигенів. Згідно із даним винаходом антитіла особливо переважно застосовувати для лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями, але не обмежуючись ними.

Крім того, у даному винаході запропоновані нові способи й композиції, призначені для збереження або підвищення когнітивної здатності до запам'ятовування в ссавця, що страждає від асоційованого з амілоїдом захворювання або стану, які полягають у тому, що тварині насамперед ссавцеві, більш переважно людині, що має потребу в такому лікуванні, вводять у терапевтично ефективній кількості моноклональне антитіло, запропоноване у винаході.

Короткий опис креслень і послідовностей

На кресленнях показано:

на фіг. 1- пептиди, виведені з послідовність A β 1-15, 1-16 і 1-16(Δ 14), 22-35 і 29-40;

на фіг. 2 - дані про зв'язування моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 з видами амілоїдів, отримані за допомогою Вестерн-блотингу й дот-блотингу;

на фіг. 3 - дані про зв'язування моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 з амілоїдними волокнами, отримані за допомогою просвітчастого електронного мікроскопа;

на фіг. 4 – результати паралельного експерименту (експерименту за типом "голова-до-голови"), що включає флуоресцентний аналіз із використанням Th-T (тіофлавін-Т) і ЯМР-спектроскопію твердого тіла міченого за допомогою U¹³-C Tyr10 і Val12-пептиду β -амілоїду 1-42.

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 7: Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого C2,

SEQ ID NO: 8: Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого

C2,

SEQ ID NO: 9: Нуклеотидна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого

C2,

SEQ ID NO: 10: Нуклеотидна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого

5 C2, включаючи сигнальні послідовності,

SEQ ID NO: 11: Нуклеотидна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого

C2,

SEQ ID NO: 12: Нуклеотидна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого

C2, включаючи сигнальні послідовності,

10 SEQ ID NO: 13-20: Амінокислотні послідовності варіантів епітопної ділянки Аβ- пептиду,

SEQ ID NO: 21: Амінокислотна послідовність легкого ланцюга мишачого C2,

SEQ ID NO: 22: Амінокислотна послідовність важкого ланцюга мишачого C2.

Даний винахід стосується застосування презентації антигену, що приведе до підвищеної доступності й стабілізації переважної конформації антигену й зрештою до утворення антитіл з унікальними властивостями.

15 Одним з варіантів здійснення винаходу є антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, або більш переважно моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, вироблене у відповідь на обробку надмолекулярною антигенною конструкцією, що містить антигенний пептид, який відповідає амінокислотній послідовності β-амілоїдного пептиду, насамперед β-амілоїдного пептиду Аβ₁₋₁₅, Аβ₁₋₁₆ і Аβ_{1-16(Δ14)}, модифікованого за допомогою гідрофобного фрагмента, такого, наприклад, як пальмітинова кислота, або гідрофільного фрагмента, такого, наприклад, як поліетиленгліколь (ПЕГ), або комбінації обох вказаних агентів, де гідрофобний і гідрофільний фрагмент відповідно зв'язують за допомогою ковалентного зв'язку з кожним кінцем антигенного пептиду принаймні через одну, насамперед одну або дві амінокислоти, такі, наприклад, як лізин, глутамінова кислота й цистеїн або будь-яка інша прийнятна амінокислота або аналог амінокислоти, що може служити як з'єднуючий елемент для зшивання гідрофобного й гідрофільного фрагмента з пептидним фрагментом. Коли як гідрофільний фрагмент застосовують ПЕГ, то вільні кінці ПЕГ ковалентно зв'язують із фосфатидилетаноламіном або будь-якою іншою сполукою, що може функціонувати як "заякірювальний" елемент, призначений для вбудовування антигенної конструкції в бішар ліпосоми.

Другим варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що розпізнає нативну конформацію амілоїду, у результаті воно специфічно зв'язується з амілоїдними олігомерами й волокнами, але не зв'язується з лінеаризованими видами амілоїдів.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, запропоноване в даному винаході й описане вище, де антитіло або його фрагмент зв'язується з мономером Аβ, при цьому афінність до зв'язування становить від принаймні приблизно 1×10^{-6} до принаймні приблизно 1×10^{-8} , насамперед від принаймні приблизно 1×10^{-6} до принаймні приблизно 1×10^{-7} , більш переважно від принаймні приблизно 1×10^{-7} до принаймні приблизно 1×10^{-8} , ще більш переважно від принаймні приблизно 1×10^{-7} до принаймні приблизно 4×10^{-7} , але переважно не має ніякої помітної перехресної реактивності із амілоїдним білком-попередником (APP).

Ще одним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, запропоноване в даному винаході й описане вище, де антитіло або його фрагмент зв'язується з волокном, фібрилою або філаментом Аβ, при цьому афінність до зв'язування становить від принаймні приблизно 1×10^{-7} до принаймні приблизно 1×10^{-9} , насамперед від принаймні приблизно 1×10^{-7} до принаймні приблизно 1×10^{-8} , більш переважно від принаймні приблизно 1×10^{-8} до принаймні приблизно 1×10^{-9} , ще більш переважно від принаймні приблизно 1×10^{-8} до принаймні приблизно 5×10^{-8} , але переважно не має ніякої помітної перехресної реактивності із амілоїдним білком-попередником (APP).

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, запропоноване в даному винаході й описане вище, афінність до зв'язування якого з волокном, фібрилою або філаментом Аβ принаймні в 5 разів, насамперед принаймні в 10 разів, більш переважно принаймні в 15 разів вище, ніж афінність до зв'язування з мономером Аβ.

60 Антитіла, запропоновані у винаході, мають здатність інгібувати in vitro і in vivo агрегацію

амілоїдогенних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерних А β_{1-42} -пептидів, що приводить до утворення високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації, насамперед при спільній інкубації з амілоїдними мономерними пептидами, насамперед β -амілоїдними мономерними пептидами, такими, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерними А β_{1-42} -пептидами, інгібує агрегацію А β -мономерів, що приводить до утворення високомолекулярних полімерних фібрил.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації, насамперед при спільній інкубації при співвідношенні молярних концентрацій аж до 1:100, більш переважно при співвідношенні молярних концентрацій від 1:30 до 1:100, але особливо переважно при співвідношенні молярних концентрацій 1:100, з амілоїдними мономерними пептидами, насамперед з β -амілоїдними мономерними пептидами, такими, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерними А β_{1-42} -пептидами, інгібує агрегацію А β -мономерів з утворенням високомолекулярних полімерних фібрил. Зокрема, рівні інгібування становлять принаймні 50 %, насамперед принаймні 65 %, більш переважно принаймні 75 %, ще більш переважно принаймні 80 %, але найбільш переважно принаймні 85-90 % або більше в порівнянні з варіантом, у якому відповідні амілоїдні мономерні пептиди інкубували в буфері (контроль).

Зокрема, спільну інкубацію антитіла, запропонованого у винаході, з амілоїдними мономерними пептидами здійснюють протягом періоду часу, що становить від 24 до 60 год., насамперед від 30 до 50 год., більш переважно протягом 48 год. при температурі від 28 до 40 °C, насамперед від 32 до 38 °C, більш переважно при 37 °C.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації протягом 48 год. при 37 °C при співвідношенні молярних концентрацій 1:100 з амілоїдними мономерними пептидами, насамперед з β -амілоїдним мономерним пептидом, таким, наприклад, як мономерний А β -пептид 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерним А β_{1-42} -пептидом, має здатність інгібувати агрегацію амілоїдних мономерів, насамперед агрегацію мономерних β -амілоїдних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерний А β_{1-42} -пептид, який приводить до утворення високомолекулярних полімерних фібрил або філаментів, принаймні на 85 %, насамперед принаймні на 89 % і найбільш переважно принаймні на 95 % у порівнянні з варіантом, у якому відповідні амілоїдні мономерні пептиди інкубували в буфері (контроль).

Конкретним варіантам здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що має високу специфічність у відношенні мономерних А β_{1-42} -пептидів, але практично не має або має лише незначну перехресну реактивність на мономерні пептиди А β_{1-38} , А β_{1-39} , А β_{1-40} та/або А β_{1-41} , насамперед антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де чутливість антитіла до амілоїдного А β_{1-42} -пептиду перевищує його чутливість до А β_{1-38} , А β_{1-39} , А β_{1-40} , А β_{1-41} аж до 100 разів, переважно від 50 до 100 разів, більш переважно від 80 до 100 разів, але найбільш переважно в 100 разів, і чутливість антитіла до амілоїдного А β_{1-42} -пептиду перевищує його чутливість до А β_{1-38} аж до раз 1000 разів, переважно від 500 до 1000 разів, більш переважно від 800 до 1000 разів, але особливо переважно в 1000, і в результаті має здатність інгібувати *in vitro* і *in vivo* агрегацію амілоїдогенних мономерних пептидів, але насамперед амілоїдного А β_{1-42} -пептиду.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що має високу чутливість до зв'язування з амілоїдним А β_{1-42} -пептидом і має здатність виявляти волокна А β_{1-42} аж до концентрації, що становить принаймні 0,001 мкг, але насамперед у концентрації, що становить від 0,5 і 0,001 мкг, більш переважно від 0,1 до 0,001 мкг, але найбільш переважно в концентрації 0,001 мкг.

Одним з найбільш переважних конкретних варіантів здійснення винаходу є антитіло,

насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має здатність виявляти волокна $A\beta_{1-42}$ аж до мінімальної концентрації, що становить 0,001 мкг, волокна $A\beta_{1-40}$ аж до мінімальної концентрації, що становить 0,1 мкг, а волокна $A\beta_{1-38}$ аж до мінімальної концентрації волокон, що становить 1 мкг.

Зв'язування антитіл, запропонованих у винаході й описаних вище, з амілоїдогенними мономерними пептидами, але насамперед з амілоїдною формою (1-42), приводить до інгібування агрегації мономерних амілоїдогенних пептидів з утворенням високомолекулярних фібрил або філаментів. Внаслідок інгібування агрегації амілоїдогенних мономерних пептидів антитіла, запропоновані в даному винаході, мають здатність попереджати або сповільнювати утворення амілоїдних бляшок, насамперед амілоїдної форми (1-42), яка, як відомо, стає нерозчинною в результаті зміни вторинної конформації і являє собою основну частину амілоїдних бляшок у головному мозку хворих тварин або людей.

Здатність антитіл, запропонованих у винаході, інгібувати агрегацію можна визначати будь-яким прийнятним методом, відомим у даній галузі, насамперед ультрацентрифугуванням у градієнті густини з наступним аналізом продукту седиментації з використанням ДСН-ПААГ на попередньо створеному градієнті та/або за допомогою флуоресцентного аналізу з використанням тіофлавіну Т (Th-T).

Даний винахід також стосується антитіл, які при спільній інкубації з раніше сформованим високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерних $A\beta_{1-42}$ -пептидів, мають здатність порушувати агрегацію (руйнувати агрегати) високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації при співвідношенні молярних концентрацій аж до 1:100, більш переважно при співвідношенні молярних концентрацій від 1:30 до 1:100, але особливо переважно при співвідношенні молярних концентрацій 1:100, з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерних $A\beta_{1-42}$ -пептидів, має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних фібрил або філаментів принаймні на 35 %, насамперед принаймні на 40 %, більш переважно принаймні на 50 %, її більш переважно принаймні на 60 %, але особливо переважно принаймні на 70 % або більше.

Зокрема, спільну інкубацію антитіла, запропонованого у винаході, з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами здійснюють протягом періоду часу, що становить від 12 до 36 год., насамперед від 18 до 30 год., більш переважно протягом 24 год. при температурі від 28 до 40 °C, насамперед від 32 до 38 °C, більш переважно при 37 °C.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації протягом 24 год. при 37 °C при співвідношенні молярних концентрацій 1:100 з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні $A\beta_{1-42}$ -пептиди, має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів принаймні на 35 %, насамперед принаймні на 40 %, більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, але особливо переважно принаймні на 70 % або більше в порівнянні з варіантом, у якому відповідні раніше сформовані амілоїдні полімерні фібрили або філаменти інкубували з контрольним наповнювачем (тільки амілоїд) (контроль).

Здатність антитіл, запропонованих у винаході, порушувати агрегацію можна визначати будь-якими прийнятними методами, відомими в даній галузі, насамперед ультрацентрифугуванням у градієнті густини з наступним аналізом седиментації з використанням ДСН-ПААГ на попередньо створеному градієнті та/або за допомогою флуоресцентного аналізу з використанням тіофлавіну Т (Th-T).

Даний винахід також стосується антитіл або їх функціональних фрагментів, які мають

чутливість до конформації.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерних А β ₁₋₄₂-пептидів, має здатність індукувати перехід β -складчастої конформації в конформацію у вигляді α -спіралі та/або довільної спіралі, але насамперед у конформацію у вигляді довільної спіралі, ще більш переважно в конформацію у вигляді довільної спіралі в конкретній ділянці молекули, насамперед в районі Val12 А β -білка, що приводить до підвищення частки конформації у вигляді довільної спіралі за рахунок β -складчастої конформації й підвищує солюбілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів. Зокрема, відбувається зниження частки β -складчастої конформації принаймні на 30 %, насамперед принаймні на 35 % і більш переважно принаймні на 40 % і більше в порівнянні з відповідними раніше сформованими амілоїдними полімерними фібрилами або філаментами, які інкубували в буфері (контроль).

Зокрема антитіло, запропоноване у винаході, спільно інкубують з амілоїдними раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами протягом періоду часів, що становить від 12 до 36 год., насамперед від 18 до 30 год., більш переважно протягом 24 год. при температурі від 28 до 40 °С, насамперед від 32 до 38 °С, більш переважно при 37 °С.

Зокрема, даний винахід стосується антитіла, насамперед моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації протягом 24 год. при 37 °С при співвідношенні молярних концентрацій 1:100 з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β ₁₋₄₂-пептиди, має здатність індукувати перехід β -складчастої конформації в конформацію у вигляді α -спіралі та/або довільної спіралі, але насамперед у конформацію у вигляді довільної спіралі, ще більш переважно в конформацію у вигляді довільної спіралі в конкретній ділянці молекули, насамперед в районі Val12 А β -білка, що приводить до підвищення частки конформації у вигляді довільної спіралі відносно β -складчастої конформації, при цьому частка останньої знижується принаймні на 30 %, насамперед принаймні на 35 % і більш переважно принаймні на 40 % і більше в порівнянні з відповідними раніше сформованими амілоїдними полімерними фібрилами або філаментами, які інкубували в буфері (контроль).

Здатність антитіла індукувати конформаційний перехід можна визначати будь-яким прийнятним методом, відомим у даній галузі, насамперед за допомогою ¹³С-ЯМР-спектроскопії твердого тіла, але переважно шляхом визначення інтегральних інтенсивностей, обумовлених конформаціями Val12 С β в А β -пептиді, насамперед в А β -пептидах 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно в мономерному А β ₁₋₄₂-пептиді.

Внаслідок порушення амілоїдогенних полімерних фібрил або філаментів антитіла, запропоновані в даному винаході, мають здатність попереджати або сповільнювати утворення амілоїдних бляшок, що приводить до полегшення симптомів, асоційованих із захворюванням, і сповільнювати або припиняти його розвиток.

Таким чином, наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, описані вище, де антитіло має здатність знижувати загальну кількість А β у головному мозку тварини, насамперед ссавця, але переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищеної концентрації А β у головному мозку.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, описані вище, де антитіло має здатність руйнувати бляшки, знижуючи тим самим завантаження бляшками (тобто відносну площу поверхні, зайняту бляшками) головного мозку тварини, насамперед ссавця, але переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищеного завантаження бляшками головного мозку. Антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, описані вище, знижує завантаження бляшками головного мозку принаймні на 20 %, насамперед принаймні на 25 %, більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно

більш ніж на 30 %.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, описані вище, де антитіло має здатність солюбілізувати бляшки, знижуючи тим самим кількість

бляшок у головному мозку тварини, насамперед ссавця, але переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищеного завантаження бляшками головного мозку. Антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, знижує кількість бляшок у головному мозку принаймні на 10 %, насамперед принаймні на 15 %, більш переважно принаймні на 20 %.

Слід розуміти, що антитіло, запропоноване у винаході, може мати одну, дві або більшу кількість описаних вище специфічних властивостей у різних комбінаціях.

Наприклад, одним з варіантів здійснення даного винаходу є антитіло, але насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, причому антитіло є біфункціональними в тому плані, що вони мають як здатність інгібувати агрегацію, так і здатність руйнувати агрегати, як описано вище, насамперед у сполученні з високим рівнем чутливості до конформації.

Ще одним варіантом винаходу є біфункціональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, але насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації з амілоїдними мономерними пептидами, насамперед β -амілоїдними мономерними пептидами, такими, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, інгібує агрегацію мономерів А β , що приводить до утворення високомолекулярних полімерних фібрил або філаментів, а також при спільній інкубації з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих полімерних фібрил або філаментів.

В конкретному варіанті здійснення винаходу спільну інкубацію біфункціонального антитіла, запропонованого у винаході, але насамперед біфункціонального моноклонального антитіла, запропонованого у винаході, з амілоїдними мономерними пептидами й раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами відповідно здійснюють при співвідношенні молярних концентрацій аж до 1:100, насамперед при співвідношенні від 1:30 до 1:100 і більш переважно при співвідношенні 1:100.

Зокрема, спільну інкубацію антитіла, запропонованого у винаході, з амілоїдними мономерними пептидами здійснюють протягом періоду часу, що становить від 24 до 60 год., насамперед від 30 до 50 год., більш переважно протягом 48 год. при температурі від 28 до 40 °C, насамперед від 32 до 38 °C, більш переважно при 37 °C, де спільну інкубацію з амілоїдом раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів здійснюють протягом періоду часу, що становить від 12 до 36 год., насамперед від 18 до 30 год., більш переважно протягом 24 год. при температурі від 28 до 40 °C, насамперед від 32 до 38 °C, більш переважно при 37 °C.

Згідно із ще одним конкретним варіантом здійснення винаходу біфункціональне антитіло, запропоноване у винаході, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих полімерних фібрил або філаментів принаймні на 10 %, насамперед принаймні на 25 %, більш переважно принаймні на 35 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, але найбільш переважно принаймні на 60-70 % або більше.

Згідно із ще одним конкретним варіантом здійснення винаходу біфункціональне антитіло, запропоноване у винаході, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, інгібує агрегацію амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, принаймні на 50 %, насамперед принаймні на 65 %, більш переважно принаймні на 75 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, але особливо переважно принаймні на 85-90 % або більше в порівнянні з варіантом, у якому відповідні амілоїдні мономерні пептиди інкубують у буфері (контроль).

Зокрема даний винахід стосується антитіла, насамперед біфункціонального антитіла, але

переважно моноклонального антитіла, насамперед біфункціонального моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло опосередковує інгібування полімеризації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні $A\beta_{1-42}$ -пептиди, та/або індукуює солюбілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні $A\beta_{1-42}$ -пептиди, за допомогою специфічного й безпосереднього зв'язування антитіла з фібрилами $A\beta$, що приводить до переходу вторинної конформації.

Даний винахід стосується антитіла, насамперед біфункціонального антитіла, але переважно моноклонального антитіла, насамперед біфункціонального моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло безпосередньо й специфічно зв'язується з β -амілоїдними волокнами, такими, наприклад, як волокна, які містять мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно з волокнами мономерних $A\beta_{1-42}$ -пептидів, та/або індукуює солюбілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні $A\beta$ -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні $A\beta_{1-42}$ -пептиди, шляхом спрямованого й специфічного зв'язування з епітопом в епітопній ділянці β -амілоїдного білка, насамперед епітопної ділянки $A\beta$ -поліпептиду, обмеженої амінокислотними залишками ak_n - ak_m , де n означає ціле число від 2 до 16, насамперед від 5 до 16, більш переважно від 8 до 16, ще більш переважно від 10 до 16, а m означає ціле число від 3 до 25, зокрема від 3 до 23, зокрема від 3 до 20, зокрема від 3 до 17, зокрема від 6 до 17, більш переважно від 9 до 17, ще більш переважно від 11 до 17, де n і m не можуть мати ідентичні значення й n завжди повинне мати значення більш низьке, ніж значення m , при цьому відмінність між n і m повинна становити ≥ 2 .

У конкретному варіанті здійснення винахід, n означає ціле число від 13 до 15, але насамперед 14, а m означає ціле число від 22 до 24, але насамперед 23.

Зв'язування антитіла, запропонованого у винаході, може індукувати конформаційний перехід у вказаного білка, насамперед перехід β -складчастої конформації в конформацію у вигляді α -спіралі та/або довільної спіралі, але насамперед у конформацію у вигляді довільної спіралі, ще більш переважно в конформацію у вигляді довільної спіралі в конкретній ділянці в молекулі, насамперед в районі Val12 $A\beta$ -білка.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має принаймні одну із вказаних вище властивостей, вибраних із групи, яка включає інгібування агрегації, порушення агрегації, індукцію конформаційного переходу, розпізнавання й безпосереднє зв'язування з епітопом, насамперед з конформаційним переривчастим епітопом в 14-23-ділянці, насамперед в 14-20-ділянці, попереджаючи або сповільнюючи формування амілоїдних бляшок, знижуючи загальну кількість розчинного $A\beta$ у головному мозку, знижуючи завантаження бляшками головного мозку, знижуючи кількість бляшок у головному мозку, зберігаючи або підвищуючи когнітивну здатність до запам'ятовування, але насамперед комбінацією двох або більшої кількості вказаних властивостей.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має принаймні 2, насамперед принаймні 3, більш переважно принаймні 4, ще більш переважно принаймні 5, 6, 7 або 8, але особливо переважно всі вищевказаними властивості.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед біфункціональне антитіло, але переважно моноклональне антитіло, особливо переважно біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має високу специфічність у відношенні мономерних $A\beta_{1-42}$ -пептидів, але практично не має або має лише незначну перехресну реактивність на мономерні пептиди $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$ та/або $A\beta_{1-41}$, насамперед антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де чутливість антитіла до амілоїдного $A\beta_{1-42}$ -пептиду перевищує його чутливість до $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ аж до 100 разів, переважно від 50 до 100 разів, більш переважно від 80 до 100 разів, але найбільш переважно в 100 разів, і чутливість антитіла до амілоїдного $A\beta_{1-42}$ -пептиду перевищує його чутливість до $A\beta_{1-38}$ аж до

1000 разів, переважно від 500 до 1000 разів, більш переважно від 800 до 1000 разів, але особливо переважно в 1000 разів, і в результаті має здатність інгібувати *in vitro* і *in vivo* агрегацію амілоїдогенних мономерних пептидів, але насамперед амілоїдного A β ₁₋₄₂-пептиду.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, насамперед
5 біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що має високу афінність до амілоїдного A β ₁₋₄₂-пептиду й має здатність виявляти волокна A β ₁₋₄₂ у концентрації, знижену принаймні аж до 0,001 мкг, але насамперед у концентрації, що становить від 0,5 і 0,001 мкг, більш переважно від
10 0,1 до 0,001 мкг, але найбільш переважно в концентрації 0,001 мкг.

Одним з найбільш переважних конкретних варіантів здійснення винаходу є антитіло, насамперед біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має здатність виявляти
15 волокна A β ₁₋₄₂ у концентрації, зниженій аж до мінімальної концентрації, що становить 0,001 мкг, а фібрили A β ₁₋₄₀ у концентрації, зниженій аж до мінімальної концентрації, що становить 0,1 мкг, а фібрили A β ₁₋₃₈ у концентрації, зниженій аж до мінімальної концентрації фібрил, що становить 1 мкг.

Ще одним об'єктом винаходу є антитіло або його фрагмент, яке(ий) розпізнає й зв'язується
20 принаймні з одним конкретним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із двома індивідуальними сайтами зв'язування на β -амілоїдному білку.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло розпізнає й зв'язується принаймні з одним індивідуальним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із двома
25 індивідуальними сайтами зв'язування на β -амілоїдному білку, де принаймні один або принаймні два індивідуальні сайти зв'язування містять принаймні один амінокислотний залишок і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки відповідно, які головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, при цьому в конкретному варіанті здійснення винаходу принаймні один залишок, що утворює перший індивідуальний сайт зв'язування, являє собою
30 Leu, а принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки, що утворюють другий індивідуальний сайт зв'язування, являють собою -Phe-Phe-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

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

Xaa₁ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln, Lys і
35 Arg;

Xaa₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;

Xaa₃ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Lys, His, Asn, Gln і
Arg;

Xaa₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu,
40 норлейцин, Met, Phe і Ile;

Xaa₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Xaa₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp;

Xaa₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu та Asp.

Зокрема, винахід стосується антитіла або його фрагменту, яке(ий) розпізнає й зв'язується
45 принаймні з одним індивідуальним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із двома індивідуальними сайтами зв'язування на β -амілоїдному білку, де принаймні один або принаймні два індивідуальні сайти зв'язування містять принаймні один амінокислотний залишок і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки відповідно, які головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, при цьому в конкретному варіанті здійснення винаходу
50 принаймні один залишок, що утворює перший індивідуальний сайт зв'язування, являє собою Leu, а принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки, що утворюють другий індивідуальний сайт зв'язування, являють собою -Phe-Phe-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

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

Xaa₁ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln, Lys і
55 Arg;

Xaa₂ Asn і Gln;

Xaa₃ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Lys, His, Asn, Gln і
Arg;

60 Xaa₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu,

норлейцин Met, Phe і Ile;

Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp,

Хаа₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp.

5 Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло або його фрагмент, у яких

Хаа₁ означає His або Arg, але насамперед His;

Хаа₂ означає Gln або Asn, але насамперед Gln;

Хаа₃ означає Lys або Arg, але насамперед Lys;

Хаа₄ означає Val або Leu, але насамперед Val;

10 Хаа₅ означає Ala або Val, але насамперед Ala;

Хаа₆ означає Glu або Asp, але насамперед Glu; і

Хаа₇ означає Asp або Glu, але насамперед Asp.

Наступним об'єктом винаходу є антитіло або його фрагмент, яке(ий) розпізнає й зв'язується
15 принаймні з одним індивідуальним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із двома
індивідуальними сайтами зв'язування, більш переважно принаймні із трьома індивідуальними
сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де принаймні кожний один або принаймні два або
принаймні три індивідуальні сайти зв'язування містять принаймні один амінокислотний залишок
і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки відповідно, які головним чином
відповідальні за зв'язування антитіла.

20 Зокрема, антитіло або його фрагмент, запропоноване(ий) у винаході, зв'язується принаймні
із двома індивідуальними сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де принаймні кожний із
двох індивідуальних сайтів зв'язування містить принаймні два послідовно розташовані
амінокислотні залишки, які головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, де принаймні
два індивідуальні сайти зв'язування локалізовані в безпосередній близькості один від одного на
25 антигені, відділяючись один від одного принаймні одним амінокислотним залишком, що не бере
участь у зв'язуванні антитіла, або бере участь в істотно меншому ступені в порівнянні із двома
послідовно розташованими амінокислотними залишками, формуючи тим самим
конформаційний переривчастий епітоп.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло або його фрагмент, яке(ий) розпізнає
30 й зв'язується принаймні з одним індивідуальним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із
двома індивідуальними сайтами зв'язування, більш переважно принаймні із трьома
індивідуальними сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де індивідуальні сайти
зв'язування містять принаймні один і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні
залишки відповідно, які головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, де принаймні
35 одна й принаймні дві послідовно розташовані амінокислоти, які відділені одна від одної
принаймні одним амінокислотним залишком, що не бере участь у зв'язуванні антитіла або бере
участь в істотно меншому ступені в порівнянні з амінокислотними залишками, які головним
чином відповідальні за зв'язування антитіла, являють собою -His- і -Lys-Leu- відповідно, що
знаходяться у наступній коровій послідовності:

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

Хаа₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;

Хаа₃ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu,
норлейцин, Met, Phe і Ile;

Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala1 Val, Leu,
45 норлейцин, Met, Phe і Ile;

Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu,
норлейцин, Met, Phe і Ile;

Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Хаа₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu та Asp;

50 Хаа₈ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp,

і де амінокислотні залишки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ не беруть участь у зв'язуванні
антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування -His- і -
Lys-Leu-.

Наступним об'єктом винаходу є антитіло або його фрагмент, яке(ий) розпізнає й зв'язується
55 принаймні з одним індивідуальним сайтом зв'язування, насамперед принаймні із двома
індивідуальними сайтами зв'язування, більш переважно принаймні із трьома індивідуальними
сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де індивідуальні сайти зв'язування містять
принаймні один і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки відповідно, які
головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, де принаймні два послідовно
60 розташовані амінокислотні залишки, що утворюють перший сайт зв'язування, являють собою -

Phe-Phe-, а принаймні один амінокислотний залишок являє собою -His-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

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

Хаа₁ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln, Lys і Arg;

Хаа₃ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;

Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln, Lys і Arg;

Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu і Ile;

Хаа₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu і Ile;

Хаа₈ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu та Asp,

Хаа₉ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp, і де амінокислотні залишки Хаа₁, Хаа₃, Хаа₆, Хаа₇, Хаа₈ і Хаа₉ не беруть участь у зв'язуванні антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування His і -Phe-Phe-.

У конкретному варіанті здійснення винаходу перші із принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків, які головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, являють собою -Lys- і -Leu-, а другі із принаймні двох послідовно розташованих залишків являють собою -Phe-Phe-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

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

Хаа₁ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln Lys і Arg;

Хаа₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;

Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe і Ile;

Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp;

Хаа₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp, і де амінокислотні залишки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не беруть участь у зв'язуванні антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування -Lys-Leu і -Phe-Phe-.

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло або його фрагмент, у якому

Хаа₁ означає His або Arg, але насамперед His;

Хаа₂ означає Gln або Asn, але насамперед Gln;

Хаа₄ означає Val або Leu, але насамперед Val;

Хаа₅ означає Ala або Val, але насамперед Ala;

Хаа₆ означає Glu або Asp, але насамперед Glu; і

Хаа₇ означає Asp або Glu, але насамперед Asp.

У наступному варіанті здійснення винаходу антитіло або його фрагмент, запропоноване(ий) у винаході, зв'язується принаймні із трьома індивідуальними сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де принаймні три індивідуальні сайти зв'язування містять принаймні один амінокислотний залишок і принаймні два послідовно розташовані амінокислотні залишки, причому ці залишки головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, де принаймні три індивідуальні сайти зв'язування локалізовані в безпосередній близькості один до одного на антигені, відділяючись один від одного принаймні одним амінокислотним залишком, що не бере участь у зв'язуванні антитіла, або бере участь в істотно меншому ступені в порівнянні з одним амінокислотним залишком і принаймні двома послідовно розташованими амінокислотними залишками відповідно, формуючи тим самим конформаційний переривчастий епітоп.

У конкретному варіанті здійснення винаходу перші з принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків, головним чином відповідальних за зв'язування антитіла, являють собою -Lys-Leu-, а другі із принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків являють собою -Phe-Phe-, а третій принаймні один амінокислотний залишок являє собою -His-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

-His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₄-Phe-Phe-Хаа₅-Хаа₆-Хаа₇ -, де

Хаа₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;

Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe і Ile;

Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;

Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp;

Хаа₇ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp, і де амінокислотні залишки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не беруть участь у зв'язуванні антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування -His-, -Lys-Leu і -Phe-Phe-.

- 5 Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло або його фрагмент, у якому Хаа₂ означає Gln або Asn, але насамперед Gln; Хаа₄ означає Val або Leu, але насамперед Val; Хаа₅ означає Ala або Val, але насамперед Ala; Хаа₆ означає Glu або Asp, але насамперед Glu; і
- 10 Хаа₇ означає Glu або Asp, але насамперед Asp.

В конкретному варіанті здійснення винахід перші із принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків, головним чином відповідальних за зв'язування антитіла, являють собою -Lys-Leu-, а другі із принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків являють собою -Phe-Phe-, а третій принаймні один амінокислотний

- 15 залишок являє собою -Asp-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:
- Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₄-Phe-Phe-Хаа₅-Хаа₆-Asp -, де Хаа₁ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає His, Asn, Gln Lys і Arg;

- Хаа₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;
- 20 Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe і Ile;
- Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;
- Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp, і де амінокислотні залишки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не беруть участь у зв'язуванні антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування -Asp-, -Lys-Leu і -Phe-Phe-.
- 25

Наступним варіантом здійснення винаходу є антитіло або його фрагмент, у якому

- Хаа₁ означає His або Arg, але насамперед His;
- Хаа₂ означає Gln або Asn, але насамперед Gln;
- 30 Хаа₄ означає Val або Leu, але насамперед Val;
- Хаа₅ означає Ala або Val, але насамперед Ala; і
- Хаа₆ означає Glu або Asp, але насамперед Glu.

В наступному варіанті здійснення винаходу антитіло або його фрагмент, запропоноване(ий) у винаході, зв'язується принаймні із чотирма індивідуальними сайтами зв'язування на β-амілоїдному білку, де чотири індивідуальні сайти зв'язування містять один амінокислотний залишок і два послідовно розташовані амінокислотні залишки відповідно, причому ці залишки головним чином відповідальні за зв'язування антитіла, де чотири індивідуальні сайти зв'язування локалізовані в безпосередній близькості один до одного на антигені, відділяючись один від одного принаймні одним амінокислотним залишком, що не бере участь у зв'язуванні антитіла, або бере участь в істотно меншому ступені в порівнянні з одним амінокислотним залишком і двома послідовно розташованими амінокислотними залишками чотирьох індивідуальних сайтів зв'язування, формуючи тим самим конформаційний переривчастий епітоп.

- Зокрема, перші із двох послідовно розташованих амінокислотних залишків, головним чином відповідальних за зв'язування антитіла, являють собою -Lys-Leu-, а другі із принаймні двох послідовно розташованих амінокислотних залишків являють собою -Phe-Phe-, перший з індивідуальних амінокислотних залишків являє собою -His-, а другий з індивідуальних амінокислотних залишків являє собою -Asp-, які знаходяться у наступній коровій послідовності:

- His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₄-Phe-Phe-Хаа₅-Хаа₆-Asp -, де
- 50 Хаа₂ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Asn і Gln;
- Хаа₄ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe і Ile;

- Хаа₅ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Ala, Val, Leu, Ser і Ile;
- Хаа₆ означає амінокислотний залишок, вибраний із групи, яка включає Glu і Asp, і де амінокислотні залишки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆, Хаа₇ не беруть участь у зв'язуванні антитіла або беруть участь в істотно меншому ступені в порівнянні із сайтом зв'язування -His-, -Asp-, -Lys-Leu і -Phe-Phe-.
- 55

- У конкретному варіанті здійснення винаходу сайти розпізнавання й зв'язування, як вони визначені вище, формують конформаційний переривчастий епітоп, локалізований в ділянці β-амілоїдного білка між амінокислотними залишками 12-24, насамперед між залишками 14-23,
- 60

більш конкретно між амінокислотними залишками 14 і 20, при цьому три індивідуальних сайти розпізнавання й зв'язування, які містять 1 і 2 амінокислотних залишки відповідно, локалізовані в положенні 16, 17 і в положенні 19 і 20, і в положенні 14 відповідно, при цьому вказані залишки головним чином відповідальні за зв'язування β -амілоїдного білка й при цьому три різні сайти розпізнавання й зв'язування відділені одним амінокислотним залишком, локалізованим у положенні 15 і 18 відповідно, ці амінокислоти не беруть участь у зв'язуванні антигену або беруть участь в істотно меншому ступені.

У конкретному варіанті здійснення винаходу послідовно розташовані амінокислотні залишки, насамперед --Lys-Leu- в положенні 16 та 17 і -Phe-Phe- у положенні 19 і 20, які головним чином відповідальні за зв'язування β -амілоїдного білка, знаходяться у наступній коровій ділянці:

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

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу послідовно розташовані амінокислотні залишки, насамперед - Lys- у положенні 16, -Leu- у положенні 17 і -Phe-Phe- у положенні 19 і 20 і -His- у положенні 14, які головним чином відповідальні за зв'язування β -амілоїдного білка, знаходяться у наступній коровій ділянці:

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

У конкретному варіанті здійснення винаходу антитіло, запропоноване у винаході, виробляється проти фрагмента антигену, що не містить вказаний індивідуальний сайт зв'язування.

Вказаний зсув в епітопній ділянці можна принаймні частково викликати застосуванням надмолекулярної антигенної конструкції, що містить антигенний пептид, який відповідає амінокислотній послідовності β -амілоїдного пептиду, насамперед β -амілоїдного пептиду A β ₁₋₁₆, модифікованого за допомогою гідрофільного фрагмента, такого наприклад, як поліетиленгліколь (ПЕГ), де гідрофільний фрагмент ковалентно зв'язаний з кожним кінцем антигенного пептиду принаймні через одну, насамперед через одну або дві амінокислоти, такі, наприклад, як лізин, глутамінова кислота й цистеїн, або будь-яку іншу прийнятну амінокислоту або аналог амінокислоти, які можуть служити зв'язувальним елементом для сполучення гідрофільного фрагмента з описаним нижче пептидним фрагментом, у процесі імунізації. Коли ПЕГ застосовують як гідрофільний фрагмент, то вільні кінці ПЕГ ковалентно зв'язують із фосфатидилетаноламіном або будь-якою іншою сполукою, що може функціонувати як "заякірковувальний" елемент, наприклад, для вбудовування антигенної конструкції в бішар ліпосоми, як представлено в даному описі.

Для зсуву епітопної ділянки як компонент протоколу імунізації можна застосовувати ліпід А.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 7.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR), послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 7.

Ще одним конкретним варіантом здійснення винаходу є антитіло, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 8.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR), послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 8.

Одним з варіантів здійснення винаходу є антитіло, що містить як варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 8, так і варіабельну ділянку легкого ланцюга, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 7.

Під обсяг винаходу підпадає антитіло, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) або варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) або обидві вказані ділянки, варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), гомологічну до кожного з пептидів, послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 7 і 8 відповідно.

Зокрема, винахід стосується антитіла або його фрагменту, запропонованого в даному винаході й описаного вище, у якому варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) має амінокислотну послідовність, що на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична до послідовності, представленої в SEQ ID NO: 7.

Винахід також стосується антитіла або його фрагменту, запропонованого в даному винаході й описаного вище, у якому варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) має амінокислотну послідовність, що на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична до послідовності, представленої в SEQ ID NO: 8.

Винахід також стосується антитіла або його фрагменту, запропонованого в даному винаході

й описаного вище, у якому й варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) і варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) разом мають амінокислотні послідовності, які на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичні послідовностям, представленим в SEQ ID NO: 7 і 8.

5 Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR), амінокислотна послідовність якої на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична до послідовності, представленої в SEQ ID NO: 7.

Ще одним конкретним варіантом здійснення винаходу є варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR), амінокислотна послідовність якої на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 10 97 %, 98 % або 99 % ідентична до послідовності, представленої в SEQ ID NO: 8

Наступним варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході й описане вище.

Зокрема, винахід стосується полінуклеотиду, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході, що містить

15 а) принаймні нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO: 9,

б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

20 г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

25 Наступним варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході, що містить

а) принаймні нуклеотидну послідовність легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO: 10,

б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

30 г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Наступним варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході, що містить

40 а) принаймні нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO: 11,

б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

45 г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході, що містить

50 а) принаймні нуклеотидну послідовність важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO: 12, або комплементарну послідовність,

б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну вказаним у підпунктах (а) і (б), або

55 г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Винахід також стосується поліуклеотиду, що містить

а) нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга.

б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в 5 підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду.

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Винахід також стосується полінуклеотиду, що містить

а) нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, що кодує легкий ланцюг,

15 б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Винахід також стосується полінуклеотиду, що містить

а) нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга.

25 б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Винахід також стосується полінуклеотиду, що містить

а) нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12, що кодує важкий ланцюг,

35 б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду,

в) послідовність, комплементарну до послідовностей, вказаних у підпунктах (а) і (б), або

г) фрагмент нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Наступним варіантом здійснення винаходу є будь-яка нуклеотидна послідовність, що гібридується з

45 а) нуклеотидною послідовністю, запропонованою у винаході й представленою в SEQ ID NO: 9, 10, 11 і 12 відповідно,

б) нуклеотидною послідовністю, що відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), послідовністю кодонів, зв'язаною з виродженістю генетичного коду.

в) послідовністю, комплементарної послідовностям, вказаним у підпунктах (а) і (б), або

50 г) фрагментом нуклеотидної послідовності, вказаної в підпункті (а), (б) або (в), який містить ділянку, яка складається із суміжних нуклеотидів, вибрану із групи, яка складається принаймні з 20 суміжних нуклеотидів, принаймні з 25 суміжних нуклеотидів, принаймні з 30 суміжних нуклеотидів, принаймні з 35 суміжних нуклеотидів, принаймні з 40 суміжних нуклеотидів, принаймні з 45 суміжних нуклеотидів і принаймні з 50 суміжних нуклеотидів.

Зокрема, винахід стосується будь-якої нуклеотидної послідовності, яка гібридується в загальноприйнятих умовах гібридизації, насамперед у строгих умовах гібридизації, з нуклеотидною послідовністю, запропонованою у винаході й представленою в SEQ ID NO: 9, 10, 11 і 12 відповідно, зокрема з її комплементарним ланцюгом.

Наступним варіантом здійснення винаходу є будь-яка нуклеотидна послідовність, що гібридується з нуклеотидною послідовністю, запропонованою в даному винаході й

представленою в SEQ ID NO: 9, 10, 11 і 12 відповідно, насамперед з її комплементарним ланцюгом, у загальноприйнятих умовах гібридизації, наприклад, із застосуванням як розчин 5×SSPE, 1 % ДСН, 1×розчину Денхардта та/або при температурі гібридизації від 35 до 70 °С, переважно 65 °С. Після гібридизації відмивання переважно здійснюють спочатку з використанням 2×SSC, 1 % ДСН, а потім 0,2×SSC при температурі від 35 до 70 °С, переважно 65 °С (опис складу SSPE, SSC і розчину Денхардта див. в Sambrook і ін., loc. cit. (у згаданому місці)).

Зокрема, винахід стосується будь-якої нуклеотидної послідовності, яка гібридується з нуклеотидною послідовністю, запропонованою в даному винаході й представленою в SEQ ID NO: 9, 10, 11 і 12 відповідно, насамперед з її комплементарним ланцюгом, у строгих умовах гібридизації, описаних, наприклад, в Sambrook і ін., вище, більш переважно в строгих умовах гібридизації, при яких гібридизацію й відмивання здійснюють при 65 °С, як описано вище.

Конкретним варіантом здійснення даного винаходу є антитіло, переважно біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридом, вибраної із групи FP 12H3, FP 12H3-C2 і FP 12H3-G2, які депоновані 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно, під реєстраційними номерами DSM ACC2752, DSM ACC 2750 і DSM ACC2751 відповідно.

Більш конкретно винахід стосується антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно, під реєстраційним номером DSM ACC2752.

Більш конкретно винахід стосується моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3-C2, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно, під реєстраційним номером DSM ACC2750.

Більш конкретно винахід стосується моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3-G2, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно, під реєстраційним номером DSM ACC2751.

Іншим конкретним варіантом здійснення даного винаходу є антитіло, переважно біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридами ET 7E3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2755.

Більш переважно винахід стосується моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами ET 7E3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2755.

Іншим конкретним варіантом здійснення даного винаходу є антитіло, переважно біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридами EJ 7H3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2756.

Більш переважно винахід стосується моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами EJ 7H3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2756.

Наступним об'єктом даний винахід є способи й композиції, яка містять антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, які призначені для попередження та/або терапевтичного лікування та/або полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром

Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями, наприклад, шляхом пасивної імунізації людини або тварини антитілом, запропонованим у винахід і описаним вище.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб застосування моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента, запропонованого у винаході, композицій антитіла, запропонованого у винаході й описаного вище, для діагностики й терапевтичного лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Зокрема, об'єктом даного винаходу є спосіб застосування моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента, запропонованого у винаході, і композицій, які містять антитіло, насамперед біспецифічне антитіло або антитіло, яке має подвійну ефективність, але насамперед біспецифічне моноклональне антитіло або моноклональне антитіло, яке має подвійну ефективність, запропоноване у винаході й описане вище, для зниження й попередження неврологічних захворювань, включаючи (але не обмежуючись нею) хвороба Альцгеймера.

Композиції, запропоновані в даному винаході, містять антитіло, насамперед біспецифічне антитіло або антитіло, яке має подвійну ефективність, запропоноване у винаході й описане вище, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, насамперед у терапевтично ефективній кількості, або більш переважно моноклональне антитіло, насамперед біспецифічне моноклональне антитіло або моноклональне антитіло, яке має подвійну ефективність, запропоноване у винаході й описане вище, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, насамперед у терапевтично ефективній кількості, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Зокрема, композиція, запропонована в даному винаході, містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має здатність інгібувати агрегацію амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні A β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерних A β_{1-42} -пептидів, що приводить до утворення високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Наступним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації при співвідношенні молярних концентрацій аж до 1:100, більш переважно при співвідношенні молярних концентрацій від 1:30 до 1:100, але особливо переважно при співвідношенні молярних концентрацій 1:100, з амілоїдними мономерними пептидами, насамперед з β -амілоїдними мономерними пептидами, такими, наприклад, як мономерні A β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні A β_{1-42} -пептиди, інгібує агрегацію A β -мономерів, яка приводить до утворення високомолекулярних полімерних фібрил або філаментів. Зокрема, рівень інгібування становить принаймні 50 %, насамперед принаймні 65 %, більш переважно принаймні 75 %, ще більш переважно принаймні 80 %, але найбільш переважно принаймні 85-90 % або більше в порівнянні з варіантом, у якому відповідні амілоїдні мономерні пептиди інкубують у буфері

(контроль) і необов'язково в сполученні з фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Зокрема, спільну інкубацію антитіла, запропонованого у винаході, з амілоїдними мономерними пептидами здійснюють протягом 48 год. при температурі 37 °С.

5 Здатність антитіл, запропонованих у винаході, інгібувати агрегацію можна визначати ультрацентрифугуванням у градієнті густини з наступним аналізом продуктів седиментації з використанням ДСН-ПААГ на попередньо створеному градієнті та/або за допомогою флуоресцентного аналізу з використанням тіофлавіну Т (Th-T).

10 Даний винахід стосується також композиції, яка містить антитіло, що може порушувати агрегацію високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β ₁₋₄₂-пептиди, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

15 Внаслідок порушення амілоїдогенних полімерних фібрил або філаментів антитіла, запропоновані в даному винаході, мають здатність попереджати або сповільнювати утворення амілоїдних бляшок, що приводить до полегшення симптомів, асоційованих із захворюванням, і сповільненню або припиненню його розвитку.

20 Наступним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації при співвідношенні молярних концентрацій від 1:30 до 1:100, переважно при співвідношенні молярних концентрацій 1:100, з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерні А β ₁₋₄₂-пептиди, насамперед при спільній інкубації протягом 24 год. при температурі 37 °С, має здатність порушувати агрегацію високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів принаймні на 35 %, насамперед принаймні на 40 %, більш переважно принаймні на 50 %, її більш переважно 25 принаймні на 60 %, але особливо переважно принаймні на 70 % або більше, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

30 Здатність антитіл, запропонованих у винаході, порушувати агрегацію можна визначати ультрацентрифугуванням у градієнті густини з наступним аналізом продуктів седиментації з використанням ДСН-ПААГ на попередньо створеному градієнті та/або за допомогою флуоресцентного аналізу з використанням тіофлавіну Т (Th-T).

35 Даний винахід стосується також композиції, яка містить антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має конформаційну чутливість, насамперед в ефективній кількості, більш переважно в терапевтично ефективній кількості.

40 Наступним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але 45 особливо переважно мономерні А β ₁₋₄₂-пептиди, насамперед при спільній інкубації протягом 24 год. при температурі 37 °С, має здатність індукувати перехід β -складчастої конформації в конформацію у вигляді α -спіралі та/або довільної спіралі, але насамперед у конформацію у вигляді довільної спіралі, ще більш переважно в конформацію у вигляді довільної спіралі в конкретній ділянці молекули, насамперед в районі Val12 А β -білка, що приводить до підвищення частки конформації у вигляді довільної спіралі за рахунок β -складчастої конформації й підвищує 50 солубілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт. Зокрема, відбувається зниження частки β -складчастої конформації принаймні на 30 %, насамперед принаймні на 35 % і більш переважно принаймні на 40 % і більше в порівнянні з відповідними раніше сформованими амілоїдними полімерними фібрилами або 55 філаментами, які інкубують у буфері (контроль).

Здатність антитіла індукувати конформаційний перехід у вторинній структурі визначають за допомогою ¹³С-ЯМР-спектроскопії твердого тіла, але переважно шляхом визначення інтегральної інтенсивності конформацій Val12 С β в А β -пептиді, насамперед в А β ₁₋₄₂-пептиді.

60 Даний винахід стосується також композиції, яка містить антитіло, насамперед

моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, насамперед у терапевтично ефективній кількості, де антитіло являє собою біфункціональне антитіло, яке має як здатність інгібувати агрегацію, так і здатність порушувати агрегацію, як вказано вище, переважно в сполученні з високою конформаційною чутливістю, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або експіцієнт.

Наступним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить біфункціональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло при спільній інкубації з амілоїдними мономерними пептидами, зокрема, β -амілоїдними мономерними пептидами, такими, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, інгібує агрегацію А β -мономерів, що приводить до утворення високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, і, крім того, при спільній інкубації з раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, утвореними в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або експіцієнт.

В конкретному варіанті здійснення винаходу спільну інкубацію біфункціонального антитіла, запропонованого у винаході, але насамперед біфункціонального моноклонального антитіла, запропонованого у винаході, з амілоїдними мономерними пептидами й раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами відповідно здійснюють при співвідношенні молярних концентрацій аж до 1:100, переважно при співвідношенні від 1:30 до 1:100 і більш переважно при співвідношенні 1:100.

В іншому варіанті здійснення винаходу спільну інкубацію з амілоїдними мономерними пептидами й раніше сформованими високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами відповідно, здійснюють протягом 48 год. і 24 год. відповідно при температурі 37 °C.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить біфункціональне антитіло, запропоноване у винаході, але насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, що має здатність порушувати агрегацію раніше сформованих полімерних фібрил або філаментів принаймні на 10 %, насамперед принаймні на 25 %, більш переважно принаймні на 35 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, але найбільш переважно принаймні на 60-70 % або більше, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або експіцієнт.

Іншим конкретним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить біфункціональне антитіло, запропоноване у винаході, але насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, що інгібує агрегацію амілоїдних мономерних пептидів, зокрема, β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але особливо переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, принаймні на 50 %, переважно принаймні на 65 %, більш переважно принаймні на 75 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, але особливо переважно принаймні на 85-90 % або більше, у порівнянні з варіантом, коли відповідні мономерні амілоїдних пептидів інкубують у буфері (контроль), і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або експіцієнт.

Зокрема даний винахід стосується композиції, яка містить антитіло, насамперед біфункціональне антитіло, але переважно моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло опосередковує інгібування полімеризації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, та/або індукує солюбілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або філаментів, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, за допомогою специфічного й безпосереднього зв'язування антитіла з волокнами А β , що приводить до переходу вторинної конформації, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або експіцієнт.

Даний винахід стосується також композиції, яка містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його

функціональні фрагменти, де антитіло безпосередньо й специфічно зв'язується з β -амілоїдними волокнами, такими, наприклад, як волокна, які містять мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно з волокнами мономерних А β_{1-42} -пептидів, та/або індукує солюбілізацію раніше сформованих високомолекулярних полімерних амілоїдних фібрил або

5 філаментів, які утворилися в результаті агрегації амілоїдних мономерних пептидів, насамперед β -амілоїдних мономерних пептидів, таких, наприклад, як мономерні А β -пептиди 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 або 1-43, але переважно мономерні А β_{1-42} -пептиди, шляхом спрямованого й специфічного зв'язування з епітопною ділянкою β -амілоїдного білка, насамперед епітопною ділянкою А β -поліпептиду, обмеженої амінокислотними залишками ак_n-ак_m, де n означає ціле число від 2 до

10 15, насамперед від 5 до 15, більш переважно від 8 до 15, ще більш переважно від 10 до 15, а m означає ціле число від 3 до 17, насамперед від 6 до 17, більш переважно від 9 до 17, ще більш переважно від 11 до 17, де n і m не можуть мати ідентичні значення й n завжди повинне мати значення більш низьке, ніж значення m, при цьому відмінність між n і m повинна становити ≥ 2 , і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

15 Зв'язування антитіла, запропонованого у винаході, може індукувати конформаційний перехід вказаного білка, насамперед перехід β -складчастої конформації в конформацію у вигляді α -спіралі та/або довільної спіралі, але насамперед у конформацію у вигляді довільної спіралі, ще більш переважно в конформацію у вигляді довільної спіралі в конкретній ділянці в молекулі, насамперед в районі Val12 А β -білка.

20 Ще одним конкретним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має принаймні одну із вказаних вище властивостей, вибраних із групи, яка включає інгібування агрегації, порушення агрегації, індукцію конформаційного переходу, розпізнавання й безпосереднє зв'язування з епітопною 14-

25 16- та/або 14-23-ділянкою, але насамперед з епітопною 14-20-ділянкою, але насамперед комбінацією двох або більшої кількості вказаних властивостей, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед біфункціональне антитіло, але переважно моноклональне антитіло, особливо

30 переважно біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що має високу специфічність у відношенні мономерних А β_{1-42} -пептидів, але практично не має або має лише незначну перехресну реактивність на мономерні пептиди А β_{1-38} , А β_{1-39} , А β_{1-40} та/або А β_{1-41} , насамперед антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, включаючи будь-яке

35 функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де чутливість антитіла до амілоїдного А β_{1-42} -пептиду перевищує його чутливість до А β_{1-38} , А β_{1-39} , А β_{1-40} , А β_{1-41} аж до 100 разів, переважно від 50 до 100 разів, більш переважно від 80 до 100 разів, але найбільш переважно в 100 разів, і чутливість антитіла до амілоїдного А β_{1-42} -пептиду перевищує його чутливість до А β_{1-38} аж до раз 1000 разів, переважно від 500 до 1000 разів, більш

40 переважно від 800 до 1000 разів, але особливо переважно в 1000, і в результаті має здатність інгібувати in vitro і in vivo агрегацію амілоїдогенних мономерних пептидів, але насамперед амілоїдного А β_{1-42} -пептиду, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Наступним конкретним варіантом здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло,

45 насамперед біфункціональне антитіло, але особливо переважно моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що має високу чутливість до зв'язування з амілоїдним А β_{1-42} -пептидом і має здатність виявляти волокна А β_{1-42} у концентрації, зниженій принаймні аж до 0,001 мкг, але насамперед у концентрації, що становить від 0,5 до

50 0,001 мкг, більш переважно від 0,1 до 0,001 мкг, але найбільш переважно в концентрації 0,001 мкг, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Одним з найбільш переважних конкретних варіантів здійснення винаходу є композиція, що містить антитіло, насамперед біфункціональне антитіло, але особливо переважно

55 моноклональне антитіло, насамперед біфункціональне моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має здатність виявляти волокна А β_{1-42} аж до мінімальної концентрації, що становить 0,001 мкг, а волокна А β_{1-40} аж до мінімальної концентрації, що становить 0,1 мкг, а волокна А β_{1-38} аж до мінімальної концентрації волокон, що становить 1 мкг, і необов'язково фармацевтично

60 прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Конкретним варіантом здійснення даного винаходу є композиція, що містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридом, вибраної із групи, яка включає FP 12H3, FP 12H3-C2 і FP 12H3-G2, які депоновані 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно під реєстраційними номерами DSM ACC2752, DSM ACC 2750 і DSM ACC2751 відповідно, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Більш конкретно винахід стосується композиції, яка містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно під реєстраційним номером DSM ACC2752, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Більш конкретно винахід стосується композиції, яка містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3-C2, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно під реєстраційним номером DSM ACC2750, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Винахід також стосується композиції, яка містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами FP 12H3-G2, депонованою 01 грудня 2005 р. і 09 грудня 2005 р. відповідно під реєстраційним номером DSM ACC2751, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Іншим конкретним варіантом здійснення даного винаходу є композиція, що містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридами ET 7E3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2755, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Винахід також стосується композиції, яка містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами ET 7E3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2755.

Іншим конкретним варіантом здійснення даного винаходу є композиція, що містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, де антитіло має характерні властивості антитіла, яке продукується лінією клітин гібридами EJ 7H3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2756, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Винахід також стосується композиції, яка містить моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, що продукується лінією клітин гібридами EJ 7H3, депонованою 08 грудня 2005 р. під реєстраційним номером DSM ACC2756, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач та/або ексципієнт.

Антитіло, насамперед моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, можна вводити в сполученні з іншими біологічно активними субстанціями й процедурами, призначеними для лікування захворювань. Інші біологічно активні субстанції можуть бути компонентами тієї ж композиції, яка вже містить антитіло, запропоноване у винаході, у формі суміші, при цьому антитіло й іншу біологічно активну субстанцію змішують у фармацевтично прийнятному розчиннику та/або носії або з ним, або вони можуть бути присутні окремо у вигляді компонента інших композицій, які можуть надходити в продаж окремо або разом у формі набору, що складається з компонентів.

Антитіло, насамперед моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, можна вводити в сполученні з іншою(ними) біологічно активною(ими) субстанцією або субстанціями по черзі або послідовно. Наприклад, моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, і першу додаткову біологічно активну субстанцію можна вводити одночасно або послідовно, вводячи субстанцію після або до введення антитіла. Якщо вибрано прийнятну схему, при якій у сполученні принаймні з одним антитілом, запропонованим у винаході, вводять більше однієї додаткової

субстанції, яка має біологічну активність, то сполуки або субстанції можна частково вводити одночасно, частково послідовно в різних комбінаціях.

Іншим об'єктом даного винаходу є суміші антитіл, що містять принаймні одне антитіло, запропоноване в даному винаході, і необов'язково одну або декілька додаткових біологічно активних субстанцій, а також способи застосування індивідуальних антитіл або сумішей, які включають композиції, яка містять антитіла або суміші антитіл, для попередження та/або терапевтичного лікування та/або полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний кровообіг, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Суміші, запропоновані у винаході, можуть містити крім антитіла, запропонованого у винаході, біологічно активну субстанцію, таку, наприклад, як відомі сполуки, застосовувані для медикаментозного лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, таким як А β -білок, що бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера.

У наступному варіанті здійснення винаходу інша біологічно активна субстанція або сполука може являти собою також терапевтичний агент, який можна застосовувати для лікування захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, який викликається амілоїдом β , або їх можна застосовувати для медикаментозного лікування інших неврологічних порушень.

Інша біологічно активна субстанція або сполука може мати біологічну дію, яка опосередковується таким же або подібним механізмом, що й антитіло, запропоноване у винаході, або мати неспоріднений механізм дії або сполучення споріднених та/або неспоріднених механізмів дії.

Як правило, інша біологічно активна сполука може являти собою енхансери нейтронної трансмісії, психотерапевтичні лікарські засоби, інгібітори ацетилхолінестерази, блокатори кальцієвих каналів, біогенні аміни, транквілізатори на основі бензодіазепінів, підсилювачі синтезу, нагромадження або вивільнення ацетилхоліну, агоністи постсинаптичного рецептора ацетилхоліну, інгібітори моноаміноксидази-A або -B, антагоністи рецептора N-метил-D-аспартатглютамату (NMDA), нестероїдні протизапальні лікарські засоби, антиоксиданти й антагоністи серотонергічного рецептора.

Зокрема, суміш, запропонована у винаході, може містити принаймні одну іншу біологічно активну сполуку, вибрану із групи, яка включає сполуки проти окисного стресу, антиапоптозні сполуки, хелати металів, інгібітори репарації ДНК, такі як пірензепін і метаболіти, 3-аміно-1-пропансульфонову кислоту (3APS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активатори секретаз, інгібітори β - і γ -секретаз, tau-білки, нейромедіатор, руйнівники β -складчастої конформації, протизапальні молекули або інгібітори холінестерази (ChEI), такі як такрин, ривастигмін, донепезил та/або галантамін, і інші лікарські засоби й харчові добавки, у сполученні з антитілом, запропонованим у винаході, і необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Згідно із ще одним варіантом здійснення винаходу суміші, запропоновані у винаході, можуть містити ніацин або мемантин у сполученні з антитілом, запропонованим у даному винаході, і необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є суміші, які містять "атипічні антипсихотичні засоби", такі, наприклад, як клозапін, зипрасидон, рисперидон, арипіпразол або оланзапін, призначені для лікування позитивних або негативних психотичних симптомів, включаючи галюцинації, марення, порушення мислення (які проявляються у вираженій непослідовності дій, психічному розладі, розладі асоціативного мислення) і ексцентричну або неорганізовану поведінку, а також ангедонію, знижену емоційну реакцію, апатію й відмову від суспільства, у

сполученні з антитілом, запропонованим у винаході, необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом.

У конкретних варіантах здійснення винаходу композиції й суміші, запропоновані у винаході й описані вище, містять антитіло, запропоноване у винаході, і біологічно активну субстанцію відповідно в терапевтично або профілактично ефективній кількості.

Інші сполуки, які можна застосовувати в сумішах у сполученні з антитілом, запропонованим у даному винаході, описані, наприклад, в WO 2004/058258 (див. насамперед стор. 16 і 17), включаючи мішені терапевтичних лікарських засобів (сс. 36-39), алкансульфонові кислоти й алкансірчану кислоту (сс. 39-51), інгібітори холінестерази (сс. 51-56), антагоністи NMDA-рецептора (сс. 56-58), естрогени (сс. 58-59), нестероїдні протизапальні лікарські засоби (сс. 60-61), антиоксиданти (сс. 61-62), агоністи рецепторів, активовані пероксисомальними проліфераторами (PPAR) (сс. 63-67), агенти, що знижують рівень холестерину (сс. 68-75); інгібітори амілоїду (сс. 75-77), інгібітори утворення амілоїду (сс. 77-78), хелатори металів (сс. 78-79), антипсихотичні засоби й антидепресанти (сс. 80-82), харчові добавки (сс. 83-89) і сполуки, що підвищують доступність біологічно активних субстанцій у головному мозку (див. стор. 89-93) і проліки (сс. 93 і 94); вказаний документ включений у даний опис як посилання.

Крім того, винахід стосується способу одержання антитіла, насамперед способу одержання моноклонального антитіла, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, запропоновані у винаході, який полягає в тому, що одержують антитіла, але насамперед моноклональні антитіла, до надмолекулярної антигенної конструкції, що містить антигенний пептид, який відповідає амінокислотній послідовності β -амілоїдного пептиду, насамперед β -амілоїдного пептиду $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ і $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, модифікованого за допомогою гідрофобних фрагментів, таких, наприклад, як пальмітинова кислота, або гідрофільного фрагмента, такого, наприклад, як поліетиленгліколь (ПЕГ), або комбінацією їх обох, де гідрофобний і гідрофільний фрагмент відповідно зв'язують за допомогою ковалентного зв'язку з кожним кінцем принаймні через одну, насамперед одну або дві амінокислоти, такі, наприклад, як лізин або будь-яка інша прийнятна амінокислота або аналог амінокислоти, які можуть служити як з'єднуючий елемент або лінкерна молекула для зшивання гідрофобного й гідрофільного фрагмента з пептидним фрагментом, такі, наприклад, як глутамінова кислота або цистеїн.

Винахід також стосується застосування моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента, запропонованого у винаході й описаного вище, та/або фармацевтичної композиції, або суміші, що містить антитіло, для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або полегшення впливу захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб одержання фармацевтичної композиції з використанням антитіла, запропонованого у винаході та/або його функціонального фрагмента, але насамперед моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента або функціонально еквівалентного антитіла, призначеної для лікування впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як

прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями, який полягає в тому, що готують препарат антитіла, запропонованого у винаході, у вигляді фармацевтично прийнятної форми.

Антитіла та/або їх функціональні фрагменти, але насамперед моноклональні антитіла та/або їх функціональні фрагменти або функціонально еквівалентне антитіло й композиції й суміші, що містять антитіло, запропоноване в даному винаході, можна застосовувати для приготування лікарського засобу, призначеного для попередження, лікування або полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Наступним варіантом здійснення винахід є спосіб зниження завантаження бляшками головного мозку тварини, насамперед ссавця, але переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищеного завантаження бляшками головного мозку, який полягає в тому, що вводять тварині, насамперед ссавцеві, але переважно людині, який потребує такого лікування, у терапевтично ефективній кількості антитіло та/або його функціональний фрагмент, але насамперед моноклональне антитіло та/або його функціональний фрагмент або функціонально еквівалентне антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, або композицію або суміш, що містить антитіло.

Зокрема, завантаження бляшками головного мозку знижують принаймні на 20 %, насамперед принаймні на 25 %, більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно більш ніж на 30 %.

Ще одним варіантом здійснення винахід є спосіб зниження кількості бляшок у головному мозку тварини, насамперед ссавця, але переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищеного завантаження бляшками головного мозку, який полягає в тому, що вводять тварині, насамперед ссавцеві, але переважно людині, який потребує такого лікування, у терапевтично ефективній кількості антитіло та/або його функціональний фрагмент, але насамперед моноклональне антитіло та/або його функціональний фрагмент або функціонально еквівалентне антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, або композицію або суміш, що містить антитіло.

Зокрема, кількість бляшок у головному мозку знижують принаймні на 10 %, насамперед принаймні на 15 %, більш переважно більш ніж на 15 %.

Ще одним варіантом здійснення винахід є спосіб зниження загальної кількості розчинного Аβ у головному мозку тварини, насамперед ссавця, але особливо переважно людини, що страждає від захворювання або стану, що приводить до підвищення концентрацій розчинного Аβ у головному мозку, який полягає в тому, що тварині, насамперед ссавцеві, але більш переважно людині, що має потребу в такому лікуванні, вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло та/або його функціональний фрагмент, але насамперед моноклональне антитіло та/або його функціональний фрагмент або функціонально еквівалентне антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, або композицію або суміш, що містить антитіло.

Об'єктом даного винаходу є спосіб попередження, лікування або полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що

супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями, шляхом введення антитіла, але насамперед моноклонального антитіла або композиції або суміші, що містить антитіло, запропоноване у винаході, тварині або людині, ураженій вказаним порушенням, який полягає в тому, що тварині, насамперед ссавцеві, але особливо переважно людині, що має потребу в такому лікуванні, вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло та/або його функціональний фрагмент, але насамперед моноклональне антитіло та/або його функціональний фрагмент або функціонально еквівалентне антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, або композицію або суміш, що містить антитіло.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є спосіб збереження або підвищення когнітивної здатності до запам'ятовування у тварини, насамперед ссавця або людини, що страждає від порушення пам'яті, який полягає в тому, що тварині, насамперед ссавцеві або людині, що має потребу в такому лікуванні, вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло, але насамперед моноклональне антитіло, запропоноване у винаході, або композицію або суміш, що містить антитіло, запропоноване у винаході й описане вище.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб приготування фармацевтичної композиції з використанням антитіла, запропонованого у винаході, та/або його функціонального фрагмента, але насамперед моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента або функціонально еквівалентного антитіла, призначеної для попередження, лікування або полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлено або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є спосіб приготування фармацевтичної композиції з використанням антитіла, запропонованого у винаході, та/або його функціонального фрагмента, але насамперед моноклонального антитіла та/або його функціонального фрагмента або функціонально еквівалентного антитіла, що призначена для збереження або підвищення когнітивної здатності до запам'ятовування у тварини, насамперед ссавця або людини, що страждає від порушення пам'яті, шляхом введення тварині, насамперед ссавцеві або людині, антитіла, але насамперед моноклонального антитіла або композиції або суміші, що містить антитіло, запропоноване у винаході й описане вище.

Ці й інші об'єкти, відмітні ознаки й переваги даного винаходу стануть очевидними після ознайомлення з наведеним нижче докладним описом варіантів здійснення винаходу й прикладеною формулою винаходу.

Поняття "поліпептид", "пептид" і "білок" у контексті даного опису використовують взаємозамінно, і вони означають біологічну молекулу, що складається з амінокислот, зв'язаних пептидним зв'язком.

У контексті даного опису згадування однини може означати "один або декілька" і, якщо не вказане інше, то воно включає множину.

Поняття "виявлення (виявлення)" або виявлений (виявлений)" у контексті даного опису означає застосування відомих методик для виявлення біологічних молекул, таких як імунохімічні або гістологічні методи, і стосуються якісного або кількісного виявлення присутності або визначення концентрації досліджуваної біологічної молекули.

Поняття "амілоїд β ", A β або β -амілоїд" має значення, відоме в даній галузі, і стосується білків або пептидів амілоїду β , білка-попередникові амілоїду β (APP), а також їх модифікацій, фрагментів і будь-яким функціональним еквівалентам. Зокрема, під поняття "амілоїд β " у контексті даного опису підпадає будь-який фрагмент, отриманий протеолітичним розщепленням

APP, але насамперед фрагменти, які беруть участь або які асоційовані з амілоїдною патологією, включаючи (але не обмежуючись ними) $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ і $A\beta_{1-43}$.

Структура й послідовності вказаних вище пептидів амілоїду β добре відомі у фахівцям у даній галузі й методи одержання вказаних пептидів або їх екстракції з головного мозку й інших тканин описані, наприклад, в Glenner та Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 1984, стор. 885-890. Крім того, пептиди амілоїду β надходять у продаж у різних формах.

Поняття "фібрили $A\beta$ " або "філамент $A\beta$ " або "амілоїдні фібрили" стосуються полімерних форм мономерного білка, що утворює індивідуальні або зв'язані у вузол волокна з постійним діаметром волокна, які є нерозчинними у водному середовищі й містять більші кількості крос- β -структур у ядрі; головним чином з бета-ланцюгами, розташованими перпендикулярно до осі волокна (1.2,3).

"Мономерний $A\beta$ " або "мономер $A\beta$ " означає повністю солюбілізований білок амілоїду β без агрегованих комплексів у водному середовищі.

Поняття "полімерний розчинний амілоїд" і "олігомерний $A\beta$ " і "олігомер $A\beta$ " стосуються багатьох агрегованих мономерів амілоїдних пептидів або амілоїдоподібних пептидів або модифікованих або вкорочених амілоїдних пептидів або інших похідних амілоїдних пептидів, що формують олігомерні або полімерні структури, які розчинні як *in vitro* у водному середовищі, так і *in vivo* в організмі ссавця або людини, більш конкретно в головному мозку, але насамперед поняття стосуються багатьох агрегованих мономерів амілоїду β ($A\beta$) або модифікованого або вкороченого амілоїду β . $A\beta$ -пептиди або їх похідні розчинні в організмі ссавця або людини, насамперед у головному мозку відповідно.

Поняття "виділений" стосується біологічної молекули, вільної принаймні від деяких компонентів, з якими вона зустрічається в природних умовах.

Поняття "антитіло" або "антитіла" у контексті даного опису мають відоме з даної галузі значення й стосуються молекул або активних фрагментів молекул, які зв'язуються з відомими антигенами, насамперед молекул імуноглобулінів і імунологічно активних фрагментів молекул імуноглобулінів, тобто молекул, які містять сайт зв'язування, що імуноспецифічно зв'язуються з антигеном. Імуноглобулін, запропонований у винаході, може стосуватися будь-якого типу (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA та IgY) або класу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG1 і IgG2) або підкласів молекул імуноглобуліну.

Згідно із даним винаходом мається на увазі, що до "антитіл" належать моноклональні антитіла, поліклональні, химерні, однокланові, біспецифічні або які мають подвійну ефективність, симіанізовані (які включають ділянки мавпячих антитіл), людські й гуманізовані антитіла, а також їх активні фрагменти. Наприклад, до активних фрагментів молекул, які зв'язуються з відомими антигенами, належать Fab- і $F(ab')_2$ -фрагменти, включаючи продукти експресійної бібліотеки Fab-фрагментів імуноглобулінів, і зв'язуються з епітопом фрагменти будь-яких антитіл і їх вказаних фрагментів.

Вказані активні фрагменти можна одержувати з антитіла, запропонованого в даному винаході, за допомогою численних методик. Наприклад, очищені моноклональні антитіла можна розщеплювати ферментом, таким як пепсин, і піддавати РХВР-гель-фільтрації. Потім відповідну фракцію, що містить Fab-фрагменти, можна збирати й концентрувати за допомогою фільтрації через мембрану й т.п. Додатковий опис загальних методик виділення активних фрагментів антитіл див., наприклад, в Khaw B. A. і ін. *J. Nucl. Med.* 23, 1982, стор. 1011-1019; Rousseaux і ін. *Methods Enzymology*, 121, з Academic Press, 1986, стор. 663-669.

Поняття "гуманізоване антитіло" стосується типу сконструйованого антитіла, у якому CDR отримані з імуноглобуліну організму-донора крім людини, інші виведені з імуноглобуліну ділянки одержують із одного (або декількох) людського(них) імуноглобуліну(ів). Крім того, залишки, що підтримують каркас, (залишки каркасної ділянки) можна змінювати для збереження афінності до зв'язування. Методи одержання "гуманізованих антитіл" добре відомі фахівцям у даній галузі (див., наприклад, Queen і ін., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86, 1989, стор. 10029-10032, Hodgson і ін., *Bio/Technology*, 9, 1991, с. 421).

"Гуманізоване антитіло" можна одержувати також за допомогою нового підходу генетичної інженерії, що дозволяє одержувати поліклональні антитіла, які нагадують людські, з дозрілою афінністю у великих тварин, таких, наприклад, як кролики (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

Поняття "моноклональне антитіло" добре відоме в даній галузі й стосується антитіла, яке у великих кількостях одержують у лабораторних умовах з індивідуального клону і яке розпізнає тільки один антиген. Моноклональні антитіла, як правило, створюють шляхом злиття продукууючої антитіла В-клітини, як правило, з коротким часом життя, зі швидко зростаючою клітиною, такою як ракова клітина (іноді її називають "імморталізованою" клітиною). утворена

гібридна клітина або гібридома швидко розмножується, створюючи клон, який продукує антитіло в великих кількостях.

Для цілей даного винаходу до "моноклонального антитіла" належать також антитіла, отримані за допомогою маточного клону, який ще не досяг повної моноклональності.

5 Поняття "функціональний еквівалент антитіла" у контексті даного винаходу стосується антитіла, яке у цілому зберігає принаймні одну з основних функціональних властивостей антитіла, у тому числі: здатність до специфічного зв'язування з білком β -амілоїду, насамперед з білком $A\beta_{1-42}$ і більш переважно з епітопом 4-16-ділянкою білка $A\beta_{1-42}$, імунореактивність *in vitro*, інгібування агрегації мономерів $A\beta_{1-42}$, що приводить до утворення високомолекулярних полімерних фібрил, та/або порушення агрегації раніше сформованих полімерних фібрил $A\beta_{1-42}$ та/або порушення правильності β -складчастої конформації й полегшення впливів захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і зв'язаний з віком амілоїдоз, включаючи (але не обмежуючись ними) неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), включаючи захворювання або стани, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, зв'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельдта-Якоба, хвороба Паркінсона, зв'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний боковий склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини й інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями, при введенні з метою профілактики або лікування. Антитіла можуть належати до будь-якого класу, такого як IgG, IgM або IgA і т.д., або будь-якого підкласу, такого як IgG1, IgG2a і т.д., і інших згаданих вище або відомих у даній галузі підкласів, але насамперед до класу IgG2. Крім того, антитіла можна одержувати за допомогою будь-якого методу, такого як фагова презентація, або одержувати в будь-якому організмі або лінії клітин, у тому числі в клітинах бактерій, комах, ссавців або іншому типі клітин або клітинних ліній, які продукують антитіла з необхідними характеристиками, такі як гуманізовані антитіла. Антитіла можна створювати також шляхом об'єднання Fab-фрагмента й Fc-ділянки з різних видів.

Поняття "біспецифічний" або "біфункціональний" і "що має подвійну ефективність" використовують у контексті даного опису як синоніми для того, щоб охарактеризувати антитіло, що володіє як здатністю інгібувати утворення амілоїдних або амілоїдоподібних волокон, так і здатністю порушувати агрегацію амілоїдних або амілоїдоподібних волокон.

Поняття "антиген" стосується повного агента або його фрагменту, що може індукувати імунну відповідь в організмі, насамперед в організмі тварини, більш переважно ссавця, включаючи людини. Поняття включає імуногени й ділянки, які відповідають за антигенність, або антигенні детермінанти.

У контексті даного опису поняття "розчинний" означає частково або повністю розчинний у водному розчині.

У контексті даного опису поняття "імуногенні" стосується субстанцій, які викликають або підсилюють виробництво антитіл, Т-клітин і інших реактивних імунних клітин, спрямованих проти імуногенного агента й, що беруть участь в імунній відповіді в організмі людини або тварин.

Імунна відповідь має місце, коли в організмі індивідуума продукується достатня кількість антитіл, Т-клітин і інших реактивних імунних клітин проти введених імуногенних композицій, запропонованих у даному винаході, для ослаблення або полегшення порушення, яке підлягає лікуванню.

50 Поняття "полімерний розчинний амілоїд" стосується багатьох агрегованих мономерів амілоїдних пептидів або амілоїдоподібних пептидів, або модифікованих або вкорочених амілоїдних пептидів, або інших похідних амілоїдних пептидів, які утворюють олігомерні або полімерні структури, розчинні в організмі ссавця або людини, зокрема, у головному мозку, але насамперед багатьох агрегованих мономерів амілоїду β ($A\beta$) або модифікованих або вкорочених пептидів амілоїду β ($A\beta$) або їх похідних, які розчинні в організмі ссавця або людини, більш переважно в головному мозку.

Поняття "гібридома" відоме в даній галузі й звичайним фахівцям у даній галузі й стосується клітини, отриманої злиттям продукуючої антитіло клітини й іморталізованої клітини, наприклад, клітини множинної мієломи. Ця гібридна клітина має здатність забезпечувати постійну поставку антитіл (див. вище визначення поняття "моноклональне антитіло" і нижче розділ "Приклади", у

яких метод злиття описаний більш докладно).

Поняття "носій" у контексті даного опису означає структуру, у яку антигенний пептид або надмолекулярну конструкцію можна вбудовувати або з якою їх можна асоціювати, здійснюючи тим самим презентацію або забезпечуючи доступність антигенних пептидів або фрагмента пептиду для імунної системи людини або тварин. Будь-яку частинку, яку можна застосовувати для лікування тварин або людини, таку, наприклад, як пухирець, частинку або тільце, що складається із частинок, можна використовувати як носій у контексті даного винаходу.

Під поняття "носій" підпадають також методи введення, при яких композиції надмолекулярних антигенних конструкцій, що містять антигенний пептид, можна транспортувати до необхідних ділянок за допомогою механізмів введення. Одним із прикладів такої системи введення є система, у якій використовують колоїдні метали, такі як колоїдне золото.

Крім того, під поняття "носій" підпадають також інші механізми введення, відомі фахівцям у даній галузі, включаючи (але не обмежуючись ними) гемоціанін лімфи равлика (KLH), бичачий сироватковий альбумін (BCA) і інші ад'юванти.

У надмолекулярній антигенній конструкції, запропонованій в даному винаході, ліпосома може виконувати подвійну функцію, у тому плані, що її можна застосовувати як носій, що містить описану вище надмолекулярну конструкцію, і в той же час вона може виконувати функцію ад'юванта, що підвищує або стимулює імунну відповідь у тварині- або людини-мішені, що підлягає лікуванню терапевтичною вакциною, запропонованою у винаході. Слід розуміти також, що композиції надмолекулярних антигенних конструкцій, запропонованих у даному винаході, можуть містити також додаткові ад'юванти, такі, наприклад, як ліпід А, квасці, фосфат кальцію, інтерлейкін 1 та/або мікрокапсули полісахаридів і білків, але насамперед детоксифікований ліпід А, такий як монофосфорильний або дифосфорильний ліпід А, або квасці, додаткові консерванти, розріджувачі, емульгатори, стабілізатори й інші компоненти, які є відомими і які знайшли застосування у відомі з існуючого рівня техніки вакцинах. Крім того, будь-яку відому в даній галузі систему ад'ювантів можна застосовувати в композиції, запропонованій в даному винаході. До таких ад'ювантів належать (але не обмежуючись ними) неповний ад'ювант Фрейнда, повний ад'ювант Фрейнда, полідисперсний β -(1,4)-зв'язаний ацетилований манан ("Acemannan"), Titermax® (ад'юванти на основі співполімеру поліоксietилену-поліоксипропілену фірми CytRx Corporation), модифіковані ліпідні ад'юванти фірми Chiron Corporation, ад'юванти, що є похідними сапоніну фірми Cambridge Biotech, убиті Bordetella pertussis, ліпополісахарид (LPS) грамнегативних бактерій, великі полімерні аніони, такі як сульфат декстрану, і неорганічні гелі, такі як квасці, гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію.

Білки-носії, які можна застосовувати в композиціях надмолекулярних антигенних конструкцій, запропонованих у даному винаході, включають (але не обмежуючись ними) білок, що зв'язує мальтозу "MBP"; бичачий сироватковий альбумін "BCA"; гемоціанін лімфи равлика "KLH"; яєчний білок, флагелін; тироглобулін; сироватковий альбумін будь-яких видів; гамма-глобулін будь-яких видів; сингенні клітини; сингенні клітини, що несуть антигени Ia; і полімери D-та/або L-амінокислот.

Крім того, поняття "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості антитіла, що при введенні людині або тварині викликає імунну відповідь, яка є достатньою для здійснення терапевтичної дії на людину або тварину. Ефективну кількість легко може визначити фахівець у даній галузі за допомогою загальноприйнятих процедур.

"Гомологію" між двома послідовностями визначають за ідентичністю послідовностей. Якщо дві послідовності, які потрібно порівняти одна з одною, розрізняються за довжиною, то ідентичність послідовностей переважно стосується відсотка нуклеотидних залишків у більш короткій послідовності, які ідентичні до нуклеотидних залишків більш довгої послідовності. Ідентичність послідовностей можна визначати за допомогою загальноприйнятих комп'ютерних програм, таких як програма Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Програма Bestfit ґрунтується на використанні локального алгоритму гомології Сміта й Ватермана (Smith i Waterman, Advances in Applied Mathematics 2, 1981, стор. 482-489), для пошуку сегмента, що характеризується найвищою ідентичністю послідовності між двома послідовностями. При використанні Bestfit або іншої програми порівняльного аналізу первинної структури послідовностей для визначення того, чи ідентична конкретна послідовність, наприклад на 95 %, послідовності, з якою проводять порівняння (референс-послідовність), запропонованої в даному винаході, параметри переважно регулюють так, щоб відсоток ідентичності розраховувати для всієї довжини референс-послідовності й при цьому при

визначенні вказаного рівня гомології дозволяється введення проломів, кількість яких становить аж до 5 % від загальної кількості нуклеотидів у референс-послідовності. Коли використовують програму Bestfit, то так званим необов'язковим параметрам переважно залишають раніше встановлені ("прийняті за замовчуванням") значення. Відхилення, що з'являються при порівнянні даної послідовності й вищеописаних послідовностей, запропонованих у винаході, можуть обумовлюватися, наприклад, додаванням, делецією, заміною, інсерцією або рекомбінацією. Таке порівняння послідовностей можна переважно здійснювати за допомогою програми "fasta20u66" (версія 2.0u66, вересень 1998 р., розробленої William R. ФЕArson і Університетом Віргінії, див. також W. R. ФЕArson, *Methods in Enzymology* 183, 1990, стор. 63-98, додані приклади, а також <http://workbench.sdsc.edu/>). Для цієї мети можна використовувати набір "параметрів, які задають за замовчуванням".

Поняття "гібридизувати" у контексті даного опису стосується загальноприйнятих умов гібридизації, переважно умовам гібридизації, при яких як розчин застосовують 5×SSPE, 1 % ДСН, 1×розчину Денхардта та/або гібридизацію проводять при температурі від 35 до 70 °С, переважно 65 °С. Після гібридизації відмивання переважно здійснюють спочатку з використанням 2×SSC, 1 % ДСН, а потім 0,2×SSC при температурі від 35 до 70 °С, переважно 65 °С (опис складу SSPE, SSC і розчину Денхардта див. в Sambrook і ін., loc. cit.). Найбільш переважними є строги умови гібридизації, описані, наприклад, в Sambrook і ін. вище. Особливо переважними строгими умовами гібридизації є, наприклад, умови, при яких гібридизацію й відмивання здійснюють при 65 °С, як описано вище. Менш переважною є гібридизація в умовах зниженої строгості, коли, наприклад, гібридизацію й відмивання здійснюють при 45 °С, і ще менш переважно, коли їх здійснюють при 35 °С.

З метою полегшення розуміння даного винаходу нижче представлений докладний опис конкретних варіантів його здійснення. Хоча даний винахід описаний з посиланням на конкретні деталі певних варіантів його здійснення, слід розуміти, що не мається на увазі, що вказані деталі можна розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Даний винахід стосується антитіл і їх функціональних фрагментів, що представляють собою чутливі до певної конформації (конформаційно чутливі) антитіла. Ці антитіла розпізнають конкретні епітопи на широкій розмаїтості амілоїдних білкових антигенів. Антитіла можна застосовувати для діагностики й терапії захворювань і порушень, які викликаються або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїду або амілоїдоподібного білка, такого як білок Аβ, що бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера.

Антитіла вводять індивідуумам з метою пасивної імунізації проти різних захворювань або порушень, включаючи (але не обмежуючись ними) захворювання, асоційовані з амілоїдним білком, такі як хвороба Альцгеймера.

Антитіла в контексті даного опису являють собою моноклональні або поліклональні антитіла, які мають здатність специфічно зв'язуватися з антигенними пептидами, характерними для різних порушень, які асоційовані з амілоїдним білком, таких як хвороба Альцгеймера.

Антитіла, запропоновані у винаході, одержують імунізацією тварин, таких як миші, щурі, кролики або будь-які види тварин, у яких можуть утворюватися нативні або людські антитіла при використанні композиції надмолекулярної антигенної конструкції.

Надмолекулярні антигенні конструкції, запропоновані в даному винаході, як правило, містять пептиди, модифіковані з метою посилення антигенної дії, при цьому вказані пептиди можна модифікувати шляхом пегілування (використовуючи поліетиленгліколь або модифікований поліетиленгліколь) або модифікувати за допомогою інших методів, наприклад, з використанням пальмітинової кислоти, поліамінокислот (наприклад, поліглїцину, поліглїстидину), полісахаридів (наприклад, полігалактуринової кислоти, полімолочної кислоти, поліглїколіду, хітину, хітозану), синтетичних полімерів (поліаміди, поліуретани, складні поліефіри) або співполімерів (наприклад, полі(метакрилової кислоти) і N-(2-гїдрокси)пропілметакриламїду) і т.п.

Модифікація пальмітиновою кислотою (пальмітоїлування), що забезпечує "заякорювання" пептиду в бішарі ліпосоми через відносно невелику довжину фрагменти жирної кислоти C_{16:0} приводить до того, що пептид практично розташований на поверхні ліпосоми. Таким чином, клітини, які процесують антиген, повинні включати повну ліпосому з пептидом, що в більшості випадків приводить до порівняно більш повільної імунної відповіді.

В одному з варіантів здійснення винаходу модифікований амілоїдний 1-15-пептид використовують для одержання антитіла, насамперед моноклонального антитіла, запропонованого у винаході. Модифікований амілоїдний 1-15-пептид можна синтезувати за допомогою методу, описаного в Nicolau і ін., 2002. Підхід, описаний в Nicolau зі співавторами, включає модифікацію антигенного пептиду шляхом здійснення щеплення на смолі ліпофільного

або гідрофобного фрагмента з кінцевими амінокислотними залишками раніше отриманого пептиду, у результаті чого одержують продукт, що має порівняно високу чистоту. Зокрема, захищену амінокислоту, насамперед захищену за допомогою Fmoc амінокислоту, приєднують до смоли за допомогою відомої хімії сполучення. Захисну групу видаляють і зшивають із другим захищеним амінокислотним залишком. Потім застосовують стандартний автоматичний пептидний синтез із використанням відомої процедури хімічного захисту, зокрема Fmoc/tBu-хімії, і стандартних захисних груп бічних ланцюгів для синтезу антигенного A β -пептиду, насамперед антигенного A β ₁₋₁₅-пептиду, шляхом сполучення амінокислот 1-15 амілоїдного білка A β ₁₋₄₂ з одержанням пептидного фрагмента, послідовність якого представлена в SEQ ID NO:1. На кінцевій стадії для подовження пептидного фрагмента зв'язують дві додаткові амінокислоти. Потім Mtt-групи можна вибірково розщеплювати й зшивати з пальмітиноювою кислотою. Після промивання смоли захисну групу видаляють і смолу одночасно розщеплюють із наступним видаленням захисних груп бічних ланцюгів за допомогою стандартної методології. Після цього одержують кінцевий продукт високої чистоти і його ідентичність підтверджують відомими в даній галузі методами, такими, наприклад, як мас-спектрометрія з використанням електроспрею.

Ліпофільний або гідрофобний фрагмент, запропонований у даному винаході, може являти собою жирну кислоту, тригліцерид або фосфоліпід, де вуглецевий каркас жирної кислоти містить принаймні 10 атомів вуглецю. Зокрема, ліпофільний або гідрофобний фрагмент являє собою жирну кислоту, вуглецевий каркас якої містить принаймні приблизно 14 атомів вуглецю й аж до приблизно 24 атомів вуглецю, при цьому під обсяг даного винаходу підпадає варіант із кожною індивідуальною кількістю атомів вуглецю в вказаному діапазоні. Більш конкретно ліпофільний або гідрофобний фрагмент має вуглецевий каркас, що складається принаймні з 14 атомів вуглецю. Прикладами гідрофобних фрагментів є (але не обмежуючись ними) пальмітинова кислота, стеаринова кислота, міристинова кислота, лауринова кислота, олеїнова кислота, лінолева кислота й ліноленова кислота й холестерин або DSPE. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу ліпофільний або гідрофобний фрагмент являє собою пальмітинову кислоту.

Для реконструкції пептиду в ліпосомі з метою посилення імунної відповіді можна застосовувати інший якір/спейсер, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ).

ПЕГ приєднують у допомогою ковалентного зв'язку до амінокислотного залишку, зв'язаному з обома кінцями пептиду, зокрема до амінокислотного залишку Glu, Cys або Lys або будь-якого іншого амінокислотного залишку, який можна використовувати для приєднання за допомогою ковалентного зв'язку ПЕГ до пептиду. Інший кінець ланцюга гідрофобного фрагмента можна ковалентно зв'язувати з функціональним елементом, таким як якір у бішарі ліпосоми, таким, наприклад, як фосфатидилетаноламін (ФЕА). У результаті цього ліпосома починає функціонувати також як ад'ювант, і пептид, знаходячись достатньо далеко від бішару, може процесуватися індивідуально, і це підвищує його імуногенність у порівнянні з пальмітоїлованим антигеном.

У конкретних варіантах здійснення винаходу надмолекулярні антигенні конструкції, запропоновані в даному винаході, містять пептидну послідовність, ковалентно зв'язану з одним пегілованим лізином на кожному з кінців. Довжина ПЕГ- (поліетиленглікольного) ланцюга може змінюватися від n=8 до n=150000 або більше, зокрема від n=10 до n=80000, більш переважно від n=20 до n=10000. У конкретному варіанті здійснення винаходу довжина ПЕГ-ланцюга не перевищує n=45, насамперед становить від n=5 до n=40, більш переважно від n=10 до n=30, і найбільш переважно n=10.

Надмолекулярні конструкції, представлені в даному описі, можна синтезувати за допомогою автоматизованого пептидного синтезу з використанням відомої процедури хімічного захисту, зокрема Fmoc/tBu-хімії, і стандартних захисних груп бічних ланцюгів. Як правило, пегілювання пептидів приводить до одержання сумішей регіоізомерів.

Для досягнення сайтспецифічного приєднання кон'югата ПЕГ-ліпід як до C- так і N- кінця A β можна використовувати частково захищені пептиди. Для цієї мети пептидні послідовності, що містять внутрішні залишки Lys або His, ортогонально захищені Lys(ivDde), додають до кожного кінця. Для полегшення синтезу можна додавати до C-кінця додатковий Gly. Захисну групу видаляють і N-ацетилюють за допомогою оцтового ангідриду з наступним вибіркоvim розщепленням ivDde-груп.

Переважною є смола, насамперед 2-хлортритильна смола, оскільки вона чутлива до дії кислот і тому дозволяє здійснювати виділення захищених пептидів.

У конкретному варіанті здійснення винаходу реакцію сполучення здійснюють у фазі розчину. Вибіркове відщеплення від смоли в м'яких умовах потім дозволяє вивільняти захищені усередині ланцюга пептиди.

У фазі розчину успішно здійснювали реакції сполучення пептидів, виведених з послідовності білка β -амілоїду, такого, наприклад, як $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO: 2), з молекулою ПЕГ, модифікованої за допомогою жирної кислоти – фосфатидилхоліну, такої, наприклад, як DSPE. Розділення моно- і двичі зшитих продуктів перед кінцевою стадією видалення захисних груп бічного ланцюга можна здійснювати за допомогою катіонообмінної хроматографії. Наступне видалення захисних груп бічних ланцюгів приводить до виділення необхідних кон'югатів із прийнятним ступенем чистоти. Очищення можна здійснювати за допомогою методів, добре відомих у даній галузі, таких, наприклад, як РХВР і т.д.

Цей підхід до синтезу N- і C-кінцевих ліпід-ПЕГ- β -амілоїдних антигенів з використанням захищених пептидів можна застосовувати для широкої різноманітності пептидних послідовностей.

Потім можна одержувати ліпосомні антигени, запропоновані у винаході, за допомогою методу, описаного в Nicolau і ін., 2002. Модифікований антигенний пептид β -амілоїду, насамперед модифікований за допомогою ПЕГ і пальмітоїлований антигенний пептид $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, $A\beta_{22-35}$ і $A\beta_{29-40}$, можна реконструювати в ліпосомних конструкціях, що представляють собою насамперед ліпосоми з діміристоїлфосфатидилхоліну (DMPC), діміристоїлфосфатидилетаноламіну (DMPEA), діміристоїлфосфатидилгліцерину (DMPG) і холестерину, що необов'язково містять монофосфорильний ліпід А.

В конкретному варіанті здійснення винаходу ліпосоми з ліпідом А використовували як ад'ювант для приготування антиамілоїдної вакцини. Діміристоїлфосфатидилхолін, -гліцерин і холестерин змішували в молярному співвідношенні 0,9:1,0:0,7. Монофосфорильний ліпід А, що представляє собою сильний імуномодулятор, додавали в прийнятній концентрації, насамперед у концентрації від 30 до 50 мг на ммоль, більш переважно 40 мг на ммоль фосфоліпідів. Потім модифікований антигенний $A\beta$ -пептид додавали в молярному співвідношенні пептиду й фосфоліпідів від 1:30 до 1:200, насамперед у молярному співвідношенні від 1:50 до 1:120, більш переважно 1:100. Розчинники видаляли, наприклад, випарюванням, і утворену плівку гідратували стерильним буферним розчином, таким, наприклад, як ЗФР.

Ліпосоми можна одержувати також методом ін'єкції в перехресному потоці, що описаний, наприклад, в Wagner і ін., Journal of Liposome Research т. 12(3), 2002, стор. 259-270. При ін'єкції ліпідних розчинів у водній буферній системі ліпіди мають тенденцію утворювати "осади (преципітати)" з наступною самоагрегацією в пухирці. Розмір отриманих пухирців залежить від таких факторів як концентрація ліпиду, швидкість перемішування, швидкість ін'єкції й вибір ліпідів. Призначена для одержання система може складатися з модуля для ін'єкції в перехресному потоці, ємностей для полярної фази (наприклад, розчин ЗФР-буфера), ємності для етанольного/ліпідного розчину й пристрою для створення тиску, але насамперед пристрою для створення тиску азоту. У той час як водний або полярний розчин нагнітають помпою через модуль для перехресної ін'єкції, етанольний/ліпідний розчин ін'єкують у полярну фазу за допомогою різних величин прикладеного тиску.

Ліпосома функціонує також як ад'ювант й пептид, знаходячись достатньо далеко від бішару, може процесуватися індивідуально, і це підвищує його імуногенність у порівнянні з пальмітоїлованим антигеном.

Вільний кінець ПЕГ приєднують за допомогою ковалентного зв'язку до молекули фосфатидилетаноламіну (де жирна кислота може являти собою: міристинову, пальмітинову, стеаринову, олеїнову кислоту й т.д. або їхню комбінацію), щоб він функціонував як "заякорювальний" елемент. Вказану надмолекулярну структуру можна закріплювати шляхом реконструювання в ліпосомах, що складаються з фосфоліпідів і холестерину (фосфатидилетаноламін, фосфатидилгліцерин, холестерин у різних молярних співвідношеннях). Можна застосовувати інші фосфоліпіди. Ліпід А застосовують у концентрації приблизно 40 мкг/ммоль фосфоліпідів.

У певних варіантах здійснення винаходу пальмітоїловані або пегіловані надмолекулярні антигенні конструкції містять пептид, який має амінокислотну послідовність β -амілоїду. Пептиди можуть також містити або відповідати повному пептиду β -амілоїду й його активні фрагменти. Крім того, пептиди, застосовувані згідно із даним винаходом, включають також $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO: 2); $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (SEQ ID NO: 3); $A\beta_{1-15}$ (SEQ ID NO: 1); і їх активні фрагменти.

Для того, щоб викликати утворення антитіл і для їх одержання й для визначення імуногенності антигенної конструкції на основі модифікованого $A\beta$, прийнятна тварина, вибрана із групи, яка включає мишей, щурів, кроликів, свиней, птахів і т.д. але переважно мишей, насамперед мишей лінії C57BL/6, імунізують антигенним пептидом. Імуногенність антигенної конструкції визначають шляхом зондування зразків сироватки через певні інтервали часу після імунізації за допомогою імуноаналізу, такого, наприклад, як ELISA.

Моноклональні антитіла, запропоновані в даному винаході, можна одержувати за допомогою класичного клонування й методів клітинного злиття, які добре відомі в даній галузі. Імуноген (антиген), що представляє інтерес, як правило, вводять (наприклад, за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції) мишам дикого типу або інбредним (наприклад, мишам лінії 5 BALB/c або переважно C57BL/6), щурам, кроликам або іншим видам тварин або трансгенним мишам, які продукують нативні або людські антитіла. Для індукції імунної відповіді імуноген можна вводити індивідуально або в суміші з ад'ювантом або експресувати із вектора (вектор реплікону VEE, коров'яча віспа), або у вигляді ДНК, або у вигляді злитого білка. Злиті білки містять пептид, проти якого потрібно одержати імунну відповідь, зшитий із білками-носіями, 10 такими, наприклад, як бета-галактозидаза, глутатіон-S-трансфераза, гемоціанін лімфи равлика (KLH) і бичачий сироватковий альбумін. У цих випадках пептиди служать як гаптени з білками-носіями. Після ревакцинації тварин, наприклад, 2 або більше разів, з організму імунізованих тварин одержують спленоцити й створювали гібридами шляхом злиття сенсibilізованих спленоцитів з лінією клітин міеломи, такою як лінія клітин мишачої міеломи SP2-0 (ATCC, Манассас, шт. Вірджинія) за допомогою добре відомих методів, описаних в Kohler і Milstein (Nature 15 256, 1975, стор. 495-497) і Harlow і Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

У конкретному варіанті здійснення винаходу антигенну конструкцію, запропоновану у винаході, насамперед композицію вакцини, що містить антигенну конструкцію у фармацевтично 20 прийнятній формі, вводять у вигляді повторних доз, зокрема від 1 до 15 доз, більш переважно від 2 до 10 доз, ще більш переважно від 3 до 7 доз, але найбільш переважно від 4 до 6 доз, з часовими інтервалами, які становлять 1-10 тижнів, насамперед з часовими інтервалами, які становлять 1-6 тижнів, більш переважно з часовими інтервалами, які становлять 1-4 тижні й ще більш переважно з часовими інтервалами від 2 до 3 тижнів. Імунну відповідь оцінюють в отриманих зразках сироватки через прийнятний проміжок часу після ревакцинації, насамперед 25 через 3-10 днів після ревакцинації, більш переважно через 4-8 днів після ревакцинації й більш переважно через 5-6 днів після ревакцинації, і визначають імуногенність антигенної конструкції за допомогою відомої методології, насамперед за допомогою одного зі звичайно застосовуваних імуноаналізів, таких, наприклад, як ELISA.

Імунізація антигенною конструкцією, запропонованою у винаході, але насамперед композицією вакцини, що містить антигенну конструкцію, запропоновану у винаході, у фармацевтично прийнятній формі, приводить до вираженої імунної відповіді в обробленій тварини. Тварин, але насамперед мишей, у яких виявлені терапевтичні титри, відбирають для злиття клітин, які продукують антиген, насамперед В-лімфоцитів, з постійно зростаючої або 35 іморталізованою лінією клітин, такою як лінія клітин міеломи. Злиття клітин індукують, додаючи поліетиленгліколь. Терапевтичні титри являють собою титри, при яких одержують позитивні результати з використанням ELISA при розведенні від 1:4000 до 1:6000, насамперед від 1:4500 до 1:5500, більш переважно 1:5000.

Гібридні клітини, які потім утворилися, клонують загальноприйнятим способом, наприклад, 40 використовуючи обмежуюче розведення, і культивують утворені клони, які продукують необхідні моноклональні антитіла.

Отримані в такий спосіб гібридами відбирають за допомогою хімічних агентів, висіваючи клітину в середовище для селекції, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (HAT).

Потім гібридами піддають скринінгу відносно здатності продукувати моноклональні антитіла 45 проти специфічних асоційованих з амілоїдом захворювань або порушень. Гібридами, які продукують антитіла, що представляють інтерес, клонують, розмножують і зберігають у замороженому стані до подальшого застосування. Переважні гібридами продукують моноклональне антитіло, що має ізотип IgG, більш переважно ізотип IgG2.

Поліклональні антитіла одержують імунізацією тварин, таких як миші або кролики або будь- 50 яка інша прийнятна тварина, описаними вище композиціями надмолекулярних антигенних конструкцій, запропонованих у даному винаході. Потім з організму тварин одержують зразки сироватки, і антитіла в сироватці піддають скринінгу відносно реактивності зв'язування з амілоїдним антигеном.

Антитіла, запропоновані у винаході, можна одержувати за допомогою відомих методів у 55 фізіологічно прийнятній формі, що може включати фармацевтично прийнятний носій, розріджувач та/або експіцієнт. Наприклад, антитіло, запропоноване у винаході й описане вище, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, насамперед моноклональне антитіло, включаючи будь-яке функціонально еквівалентне антитіло або його функціональні фрагменти, поєднують із фармацевтично прийнятним носієм, 60 розріджувачем та/або експіцієнтом з одержанням терапевтичної композиції. Прийнятні

фармацевтичні носії, розріджувачі та/або ексципієнти добре відомі в даній галузі, і до них ставляться, наприклад, забуферені фосфатом фізіологічні розчини, вода, емульсії, такі як емульсії типу масло/вода, різні типи змочувальних агентів, стерильні розчини й т.д.

5 Препаративну форму фармацевтичної композиції, запропонованій у винаході, можна одержувати за допомогою загальноприйнятої методології, відомої фахівцям у даній галузі.

Композиції, запропоновані в даному винаході, можна вводити індивідуумові у твердій, рідкій формі або у вигляді аерозолі, які містять прийнятну фармацевтично ефективну дозу. Прикладами твердих композицій є пігулки, креми й імплантовані стандартні дози. Пігулки можна вводити перорально. Терапевтичні креми можна наносити місцево. Імплантовані стандартні 10 дози можна наносити місцево, приклад, на ділянку пухлини, або можна імплантувати із метою системного вивільнення терапевтичної композиції, наприклад, підшкірно. Прикладами рідких композицій є препаративні форми, адаптовані для внутрішньом'язової, підшкірної, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної ін'єкції, або препаративні форми для місцевого або внутрішньоочного нанесення. Прикладами препаративних форм у вигляді аерозолі є застосовувані шляхом інгаляції препаративні форми, призначені для введення в легені. 15

Композиції можна вводити за допомогою стандартних шляхів введення. Як правило, композицію можна вводити з використанням місцевого, перорального, ректального, назального або парентерального (наприклад, внутрішньовенні, підшкірні або внутрішньом'язового) шляху введення. Крім того, композицію можна включати в матриці, що забезпечують пролонговане вивільнення, наприклад, з біорозкладних полімерів, полімери можна імплантувати в ділянку, у 20 яку потрібно здійснювати введення, наприклад, в ділянку пухлини. Метод передбачає введення однократної дози, введення повторних доз через попередньо встановлені інтервали часу й пролонговане введення протягом попередньо певного періоду часу.

Застосовувана в даному винаході матриця, що забезпечує пролонговане вивільнення, являє собою матрицю, виготовлену з матеріалів, як правило, полімерів, які розщеплюються шляхом ферментативного або кислотного/лужного гідролізу або шляхом розчинення. При внесенні в організм матриця піддається впливу ферментів і загальної води організму. Матрицю, що 25 забезпечує пролонговане вивільнення, слід вибирати з біосумісних матеріалів, таких як ліпосоми, полілактиди (полімолочна кислота), полігліколід (полімер гліколевої кислоти), співополімер полілактиду й гліколіду (співополімери молочної кислоти й гліколевої кислоти), поліангідріди, складні полі(орто)ефіри, поліпептиди, гіалуронова кислота, колаген, хондротинсульфат, карбонові кислоти, жирні кислоти, фосфоліпіди, полісахариди, нуклеїнові 30 кислоти, поліамінокислоти, амінокислоти, такі як фенілаланін, тирозин, ізолейцин, полінуклеотиди, полівінілпропілен, полівінілпіролідон і силікон. Переважна біорозкладна матриця являє собою матрицю з будь-якого наступного матеріалу: полілактид, полігліколід або співополімер полілактиду й гліколіду (співополімери молочної кислоти й гліколевої кислоти). 35

Як добре відомо фахівцям у даній галузі, доза композиції повинна залежати від ряду факторів, таких, наприклад, як стан, який підлягає лікуванню, конкретна застосовувана композиція й інші клінічні фактори, такі як вага, розмір, стать й загальний стан здоров'я 40 пацієнта, площа поверхні тіла, конкретна сполука або композиція, що підлягає введенню, інші одночасно застосовувані лікарські засоби й шлях введення.

Композицію можна вводити в сполученні з іншими композиціями, що містять біологічно активну субстанцію або сполуку, насамперед принаймні одну сполуку, вибрану із групи, яка включає сполуки проти окисного стресу, антиапоптозні сполуки, хелати металів, інгібітори 45 репарації ДНК, такі як пірензепін і метаболіти, 3-аміно-1-пропансульфонову кислоту (ZAPS), 1,3-пропандисульфонат (1,3PDS), активатори секретаз, інгібітори β - і γ -секретаз, τ -білки, нейромедіатор, руйнівники β -складчастої конформації, протизапальні молекули, "атипічні антипсихотичні засоби", такі, наприклад, як клозапін, зипрасидон, рисперидон, арипіпразол або оланзапін, або інгібітори холінестерази (ChEI), такі як такрин, ривастигмін, донепезил та/або 50 галантамін, і інші лікарські засоби й харчові добавки, такі, наприклад, як вітамін B12, цистеїн, попередник ацетилхоліну, ліцитин, холін, Ginkgo biloba, ацетил-L-карнітин, ідебон, пропентофілін або похідне ксантину, у сполученні з антитілом, запропонованим у даному винаході, і необов'язково фармацевтично прийнятним носієм та/або розріджувачем та/або ексципієнтом і в сполученні із процедурами, призначеними для лікування захворювань. 55

Білкова фармацевтично активна діюча речовина може бути присутня у кількості від 1 нг до 10 мг на дозу. Як правило, схема застосування може передбачати введення від 0,1 мкг до 10 мг антитіла, запропонованого у винаході, насамперед від 1,0 мкг до 1,0 мг і більш переважно від 1,0 мкг до 100 мкг, при цьому всі індивідуальні кількості, що входять у вказаний діапазон, підпадають під обсяг винаходу. Якщо введення здійснюють шляхом безперервної інфузії, то 60 більш прийнятна доза може становити від 0,01 мкг до 10 мг на кілограм ваги тіла в год., при

цьому всі індивідуальні кількості, що входять у вказаний діапазон, підпадають під обсяг винаходу.

Введення, як правило, є парентеральним, наприклад, внутрішньовенним. Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії й емульсії. До неводних розчинників належать (але не обмежуючись ними) пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як маслинова олія, і ін'єковані органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Водні розчинники можна вибирати із групи, яка включає воду, спиртові/водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи фізіологічний розчин і забуферені середовища. Парентеральні наповнювачі включають розчин хлориду натрію, декстрозу Рінгера, декстрозу й хлорид натрію, лактований розчин Рінгера або рідкі жири. Наповнювачі для внутрішньовенного введення являють собою добавки для заповнення дефіциту рідини або живильних речовин, електролітні добавки (наприклад, на основі декстрози Рінгера) і інші речовини. Можуть бути присутні також консерванти, такі, наприклад, як антимікробні засоби, антиоксиданти, хелатуючі агенти, інертні гази й ін.

Фармацевтична композиція може містити також білкові носії, такі, наприклад, як сироватковий альбумін або імуноглобулін, зокрема людського походження. Додаткові біологічно активні агенти можуть бути присутні у фармацевтичній композиції, запропонованій у винаході, залежно від призначення.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є способи й набори, призначені для виявлення й діагностики асоційованих з амілоїдом захворювань або станів, для діагностики схильності до асоційованого з амілоїдом захворювання або стану або для моніторингу мінімальних залишкових ознак захворювання в пацієнта або передбачення чутливості пацієнта до лікування з використанням антитіла або композиції вакцини, запропонованих у винаході й описаних вище. Ці методи включають відомі імунологічні методи, які звичайно застосовують для виявлення й кількісної оцінки субстанцій у біологічних зразках або в умовах *in situ*.

Діагностування асоційованого з амілоїдом захворювання або стану або схильності до асоційованого з амілоїдом захворювання або стану в пацієнта можна здійснювати шляхом виявлення імуноспецифічного зв'язування моноклонального антитіла або його активного фрагмента з епітопом амілоїдного білка в зразку або *in situ*, який полягає в тому, що приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або ділянку організму, що, як очікується, може містити амілоїдний антиген, з антитілом, що зв'язується з епітопом амілоїдного білка, дають можливість антитілу зв'язатися з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу, виявляють формування імунологічного комплексу й встановлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу й присутністю або відсутністю амілоїдного антигену в зразку або специфічній частині або ділянці організму, необов'язково здійснюють порівняння кількості імунологічного комплексу з кількістю комплексу в здоровому контрольному зразку, при цьому збільшення кількості агрегатів у порівнянні з кількістю в здоровому контрольному зразку свідчить про те, що пацієнт страждає або має ризик розвитку асоційованого з амілоїдом захворювання або стану.

Моніторинг мінімальних залишкових ознак захворювання в пацієнта після лікування антитілом або композицією вакцини, запропонованими у винаході, можна здійснювати шляхом виявлення імуноспецифічного зв'язування моноклонального антитіла або його активного фрагмента до епітопу амілоїдного білка в зразку або *in situ*, який полягає в тому, що приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або ділянку організму, що, як очікується, може містити амілоїдний антиген, з антитілом, що зв'язується з епітопом амілоїдного білка, дають можливість антитілу зв'язатися з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу, виявляють формування імунологічного комплексу й встановлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу й присутністю або відсутністю амілоїдного антигену в зразку або специфічній частині або ділянці організму, необов'язково здійснюють порівняння кількості імунологічного комплексу з кількістю комплексу в здоровому контрольному зразку, при цьому збільшення кількості агрегатів у порівнянні з кількістю в здоровому контрольному зразку свідчить про те, що пацієнт ще страждає від мінімальних залишкових ознак захворювання.

Передбачення чутливості пацієнта до лікування з використанням антитіла або композиції вакцини, запропонованих у винаході, можна здійснювати шляхом виявлення імуноспецифічного зв'язування моноклонального антитіла або його активного фрагмента до епітопу амілоїдного білка в зразку або *in situ*, який полягає в тому, що приводять у контакт зразок або специфічну частину організму або ділянку організму, що, як очікується, може містити амілоїдний антиген, з антитілом, що зв'язується з епітопом амілоїдного білка, дають антитілу зв'язатися з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу, виявляють формування імунологічного

комплексу й встановлюють кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу й присутністю або відсутністю амілоїдного антигену в зразку або специфічній частині або ділянці організму, необов'язково здійснюють порівняння кількостей імунологічного комплексу до й після початку лікування, при цьому зниження кількості агрегатів свідчить про те, що існує більша ймовірність того, що пацієнт буде чутливим до лікування.

Біологічні зразки, які можна застосовувати для діагностики асоційованого з амілоїдом захворювання або стану, для діагностики схильності до асоційованого з амілоїдом захворювання або стану або для моніторингу мінімальних залишкових ознак захворювання в пацієнта або передбачення чутливості пацієнта до лікування з використанням антитіла або композиції вакцини, запропонованих у винаході й описаних вище, являють собою, наприклад, рідини, такі як сироватка, плазма, слина, шлункові секрети, слизова, спинномозкова рідина, лімфатична рідина й т.п., або зразки клітин або тканин, отримані з організму, такі як нейронна тканина, тканина головного мозку, серцева або судинна тканина. Для виявлення присутності або відсутності амілоїдного антигену в зразку можна застосовувати будь-який імуноаналіз, відомий звичайному фахівцеві в даній галузі (див. Harlow i Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, стор. 555-612), такий, наприклад, як аналізи, які застосовують у методах виявлення з використанням вторинних реагентів для виявлення, ELISA і аналізи імунопреципітації й аглютинації. Докладний опис цих аналізів представлено, наприклад, в WO 96/13590 на ім'я Maertens i Stuyver, Zrein i ін., 1998 і в WO96/29605.

Для встановлення діагнозу *in situ* антитіло або його будь-який активний і функціональний фрагмент можна вводити в організм, що підлягає діагностуванню, за допомогою методів, відомих у даній галузі, таких, наприклад, як внутрішньовенна, внутрішньоназальна, внутрішньоочеревинна, внутрішньочеребральна, внутрішньоартеріальна ін'єкція, так, щоб могло відбутися специфічне зв'язування антитіла, запропонованого у винаході, з епітопною ділянкою на амілоїдному антигені. Комплекс антитіло/антиген можна виявляти шляхом приєднання мітки до антитіла або його функціональному фрагменту.

Імуноаналізи, які застосовують в діагностиці або застосовувані для діагностики схильності до асоційованого з амілоїдом захворювання або стану або для моніторингу мінімальних залишкових ознак захворювання в пацієнта або передбачення чутливості пацієнта до лікування з використанням антитіла або композиції вакцини, запропонованих у винаході й описаних вище, як правило, засновані на застосуванні мічених антигенів, антитіл або вторинних реагентів, призначених для виявлення. Ці білки або реагенти можна мітити за допомогою сполук, як правило, добре відомих фахівцям у даній галузі, таких як ферменти, радіоактивні ізотопи й флуоресцентні, люмінісцентні й хромогенні субстанції, включаючи пофарбовані частинки, такі як колоїдне золото й гранули з латексу. Серед вказаних методів мічення за допомогою радіоактивних ізотопів можна застосовувати практично у всіх типах аналізів і з найбільшою кількістю варіацій. Кон'юговані з ферментами мітки є особливо переважними, коли потрібно уникнути застосування радіоактивності або коли потрібне швидке одержання результатів. Флуорохроми, хоча для їх застосування потрібне дороге обладнання, забезпечують дуже чутливий метод виявлення. Антитіла, застосовувані в цих аналізах, являють собою моноклональні антитіла, поліклональні антитіла й поліклональні антитіла, очищені на основі афінності.

В іншому варіанті антитіло можна мітити непрямо шляхом взаємодії з міченими субстанціями, які мають афінність до імуноглобуліну, такими як протеїн А або G або вторинні антитіла. Антитіло можна кон'югувати із вторинною субстанцією й виявляти за допомогою міченої третьої субстанції, що має афінність до другої субстанції, кон'югованої з антитілом. Наприклад, антитіло можна кон'югувати із біотином і кон'югат антитіло-біотин виявляти за допомогою міченого авідину або стрептавідину. Аналогічно до цього антитіло можна кон'югувати із гаптенем і кон'югат антитіло-гаптен виявляти за допомогою міченого антитіла до гаптену.

Фахівцям у даній галузі повинні бути добре відомі вказані й інші прийнятні мітки, які можна застосовувати згідно із даним винаходом. Зв'язування цих міток з антитілами або їх фрагментами можна здійснювати за допомогою стандартних методів, як правило, відомих звичайним фахівцям у даній галузі. Загальноприйняті методики описані в Kennedy J. H. i ін., *Clin. Chim. Acta* 70, 1976, стор. 1-31; і в Schurs A. H. W. M. i ін., *Clin. Chim Acta* 81, 1977, стор. 1-40. Згадані в останньому посиланні методи сполучення являють собою методи на основі глутарового альдегіду, метод на основі періодату, метод на основі дималеїмиду й т.д., всі вони включені в даний опис як посилання.

У сучасних імуноаналізах застосовують метод, заснований для використання подвійних

антитіл, для виявлення присутності аналізованої речовини, при якому антитіло мітять побічно шляхом реактивності із другим антитілом, що попередньо мітять міткою, яка виявляється. Друге антитіло переважно являє собою антитіло, що зв'язується з антитілами тварини, з якого моноклональне антитіло отримане. Інакше кажучи, якщо моноклональне антитіло являє собою мишаче антитіло, то мічене друге антитіло являє собою антимишаче антитіло. Для моноклонального антитіла, призначеного для застосування в описаному нижче аналізі, ця мітка переважно являє собою сенсibilізовану антитілом гранулу, переважно магнітну гранулу. Для поліклонального антитіла, призначеного для застосування в імуноаналізах, представлених у даному описі, мітка переважно являє собою молекулу, яку виявляють, таку як радіоактивна, флуоресцентна або електрохемілюмінісцентна субстанція.

Згідно із даним винаходом можна застосовувати також альтернативну систему, засновану на використанні подвійних антитіл, що часто називають системами швидкого формату, оскільки вони адаптовані до швидкого виявлення присутності аналізованої речовини. Для цієї системи потрібно висока афінність антитіла й аналізованої речовини. Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу присутність амілоїдного антигену визначають із використанням пари антитіл, кожне з яких специфічно для амілоїдного антигену. Одне із вказаної пари антитіл позначають у контексті даного опису як "ідентифікуюче антитіло", а друге із вказаної пари антитіл позначають у контексті даного опису як "імобілізоване антитіло". Моноклональне антитіло, запропоноване в даному винаході, можна застосовувати як імобілізоване антитіло, так і як ідентифікуюче антитіло. Моноклональне антитіло, запропоноване в даному винаході, можна застосовувати також як і імобілізоване, і ідентифікуюче антитіло в одному аналізі. Таким чином, одним з варіантів здійснення даного винаходу є застосування сендвіч-аналізу з використанням подвійного антитіла для виявлення амілоїдного антигену в зразку біологічної рідини. У цьому аналізі аналізовану речовину (амілоїдний антиген) поміщають посередині між ідентифікуючим антитілом і імобілізованим антитілом, при цьому імобілізоване антитіло оборотно імобілізоване на твердій основі. Ідентифікуюче антитіло повинне містити мітку, яку виявляють, призначену для ідентифікації присутності сендвіча антитіло-аналізована речовина й, як наслідок, присутності аналізованої речовини.

Прикладами твердофазних субстанцій є (але не обмежуючись ними) титраційні мікропланшети, лабораторні пробірки з полістиролу, магнітні, пластикові або скляні гранули й предметні стекла, які добре відомі в галузі радіоімуноаналізів і імуоферментних аналізів. Методи сполучення антитіл із твердими фазами добре відомі фахівцям у даній галузі. В останні роки цілий ряд пористих матеріалів, таких як найлон, нітроцелюлоза, ацетат целюлози, скляні волокна й інші пористі полімери, почали застосовувати як тверді основи.

Даний винахід також стосується діагностичного набору, призначеного для виявлення амілоїдного антигену в біологічному зразку, що містить вказану вище композицію. Крім того, даний винахід стосується вказаного діагностичного набору, що крім вказаної вище композиції містить також реагент для виявлення, описаний вище. Поняття "діагностичний набір" стосується в цілому будь-якого діагностичного набору, відомому в даній галузі. Більш конкретно останнє поняття стосується діагностичного набору, описаному в Zrein і ін., 1998.

Ще одним об'єктом даного винаходу є нові імунозонди й тест-набори, призначені для виявлення й діагностики асоційованих з амілоїдом захворювань і станів, які містять антитіла, запропоновані в даному винаході. Для одержання імунозондів антитіла прямо або непрямо приєднують до прийнятної репортерної молекули, наприклад, ферменту або радіонукліду. Тест-набір включає контейнер, що містить одне або декілька антитіл, запропонованих у даному винаході, і інструкції із застосування антитіл для цілей зв'язування з амілоїдним антигеном з одержанням імунологічного комплексу й виявлення формування імунологічного комплексу, при цьому присутність або відсутність імунологічного комплексу корелює із присутністю або відсутністю амілоїдного антигену.

Приклади

Антигени, які застосовують для одержання мишачих моноклональних антитіл

Таблиця 1

Антитіла й антигенні конструкції, які застосовують для одержання вказаних антитіл

Мишаче МАт	Антиген/послідовність	Лінкер	Якір	Ад'ювант
mACI-01-Ab7	A β ₁₋₁₆	ПЕГ	DSPE	Ліпід А
mACI-02-Ab6	A β ₁₋₁₆ (Δ 14)	ПЕГ	DSPE	Ліпід А
mACI-11-Ab9	A β ₂₂₋₃₅	ПЕГ	DSPE	Ліпід А
mACI-12-Ab11	A β ₂₉₋₄₀	ПЕГ	DSPE	Ліпід А
mACI-24-Ab4	A β ₁₋₁₅	-	Palm	Ліпід А

Приклад 1: Способи одержання пальмітоїлованих надмолекулярних антигенних конструкцій, що містять A β ₁₋₁₅

5 Синтез антигенного тетра(пальмітоїлізин)-A β ₁₋₁₅-пептиду

Пальмітоїлований амілоїдний 1-15-пептид синтезували за допомогою вдосконаленого описаного раніше методу (Nicolau i in., 2002). Вказаний новий підхід включає щеплення на смолі пальмітинової кислоти з кінцевими залишками Lys раніше отриманого пептиду замість східчастого твердофазного синтезу, за допомогою якого включають модифіковану 9-флуоренілметоксикарбонілом амінокислоту (Fmoc)-Lys(Pal)-ОН. Цей новий підхід збільшує ефективність сполучення й дозволяє одержувати продукт істотно більш високої чистоти. Так, ортогонально захищену амінокислоту Fmoc-Lys(Mtt)-ОН приєднували до смоли Ванга за допомогою синтезу, заснованого на сполученні з використанням гексафторфосфату 2-(1Н-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію (ГБТУ). Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 %-ного піперидину в ДМФ і здійснювали сполучення із другим залишком Fmoc-Lys(Mtt)-ОН. Потім загальноприйнятий автоматичний пептидний синтез із використанням Fmoc/tBu-хімії й загальноприйняті захисні групи бічних ланцюгів застосовували для сполучення наступних 15 амінокислот з одержанням пептидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1. І, нарешті, здійснювали сполучення останніх двох амінокислот Fmoc-Lys(Mtt)-ОН. Потім Mtt-групи вибірково розщеплювали за допомогою 1 % трифтороцтової кислоти (ТФК) у дихлорметані й після цього здійснювали сполучення з пальмітиновою кислотою з використанням ГБТУ. Після промивання смоли Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 %-ного піперидину в диметилформаміді (ДМФ) і одночасно остаточно розщеплювали смолу й видалення захисних груп бічних ланцюгів здійснювали за допомогою ТФК у стандартних умовах. Після розтирання в холодному простому діетиловому ефірі одержували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору. За допомогою мас-спектрометрії з використанням електроспрею підтверджували ідентичність продукту (очікувана величина m/z: 1097,9 ([M]3+); виявлена: 1096,8 ([M-3H]3+), при цьому не виявлене ніяких інших три- ди- або монопальмітоїлованих пептидів.

Приклад 2: Способи одержання надмолекулярних антигенних конструкцій

30 Синтез пегілованого антигенного β -амілоїдного пептиду

Для посилення імунної відповіді інший якір/спейсер застосовували для реконструкції пептиду в ліпосомі, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ). ПЕГ приєднували за допомогою ковалентного зв'язку до обох кінців пептиду. Інший кінець ланцюга (ПЕГ, n=70) ковалентно зв'язували з фосфатидилетаноламіном (ФЕА), що функціонує як елемент для "заякорювання" у бішарі ліпосоми. Таким чином, ліпосома починала функціонувати як ад'ювант, і пептид, знаходячись достатньо далеко від бішару, міг процесуватися індивідуально, що підвищувало його імуногенність у порівнянні з пальмітоїлованим антигеном.

Надмолекулярні конструкції, представлені в даному описі, синтезували індивідуально з використанням стандартного методу захисту бічних ланцюгів амінокислот за допомогою Fmoc/tBu. Як правило, пегілування пептидів приводить до одержання сумішей регіоізомерів. У даному описі продемонстрований зручний метод сайтспецифічного приєднання кон'югата ПЕГ-ліпід до С-, так і до N-кінця A β з використанням частково захищених пептидів.

Для пептидних послідовностей, які містять усередині ланцюга залишки Lys або His (1-16, 1-16(Δ 14), 22-35), до кожного кінця додавали ортогонально захищений Lys(ivDde). Додатковий Gly додавали до С-кінця для полегшення синтезу. Fmoc-групу видаляли за допомогою 20 %-ного піперидину в ДМФ і здійснювали N-ацетилювання за допомогою оцтового ангідриду. Для вибіркового розщеплення ivDde-груп використовували обробку 3 %-ним гідратом гідазину в ДМФ протягом 1 год. Для цієї мети 2-хлортритильна смола є більш переважною в порівнянні з більш широко застосовуваною смолою Ванга, оскільки вона є істотно більш стійкою до гідразінолізу. Крім того, 2-хлортритильна смола має дуже високу чутливість до кислот і в

результаті, на відміну від смоли Ванга, дозволяє здійснювати виділення захищених пептидів. Природно, необхідно здійснювати реакцію сполучення у фазі розчину, оскільки сполучення зв'язаного зі смолою пептиду з попередньо активованим пегілованим ліпідним реагентом DSPE-ПЕГ-SPA не приводить до одержання якого-небудь продукту сполучення. Таким чином, вибіркове відщеплення від смоли в м'яких умовах (оцтова кислота/трифторетанол/дихлорметан, 1:1:8, 1 год., КТ) дозволяло одержувати пептиди із внутрішніми захисними групами.

Реакції сполучення у фазі розчину дозволяли успішно одержувати пептид, виведений з послідовності A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 2), з використанням DSPE-ПЕГ-SPA у ДМСО й надлишку основи. Потім реакції припиняли, додаючи надлишок етаноламіну протягом 2 год., і розчин ліофілізували.

Для послідовності 29-40 не було потрібно застосування стратегії спеціального захисту.

Після очищення за допомогою PXBP (напівпрепаративна, із оберненою фазою, колонка C₄) одержували N- і C-кінцеві кон'югати ПЕГ-ліпід, що мають чистоту 50-70 %, ідентичність яких підтверджували за допомогою MALDI (мас-спектрометрія з використанням опосередкованого матрицею лазерної десорбції/іонізації). Для кожної послідовності виявлені істотні варіації з позицій легкості здійснення реакції сполучення й умов, які відповідно регулювали (температура, кількість молярних еквівалентів DSPE-ПЕГ-SPA, тривалість). Для видалення надлишку DSPE-ПЕГ-SPA з необхідного продукту застосовували очищення за допомогою PXBP. Розділення продуктів, отриманих у результаті одного й двох сполучень, перед кінцевою стадією видалення захисних груп можна здійснювати за допомогою катіонообмінної хроматографії. Наступне видалення захисних груп бічного ланцюга й відділення надлишку DSPE-ПЕГ-SPA після припинення реакції дозволяло виділяти необхідні кон'югати із прийнятним ступенем чистоти.

Вказаний підхід синтезу β -амілоїдних антигенів з N- і C-кінцевими кон'югатами ліпід-ПЕГ з використанням захищених пептидів застосовно до широкої розмаїтості пептидних послідовностей.

Приклад 3: Антитіла, до утворення яких приводить обробка надмолекулярними антигенними конструкціями

3.1 Одержання МАТ до надмолекулярної антигенної конструкції, що містить пальмітоїлований A β ₁₋₁₅:

Пальмітоїлований антиген (ACI-24, A β ₁₋₁₅) застосовували для імунізації мишей лінії C57BL/6, яку здійснювали із двотижневими інтервалами. Кожним антигеном імунізували по 10-12 тварин (застосовуваний для ін'єкції об'єм, що містить 8 нмолів пептиду, становив 200 мкл). Останню ін'єкцію здійснювали за 4 дні до умертвіння тварин. Після 5 ревакцинацій мишей, у яких виявлені терапевтичні титри (коли розведення сироватки 1:5000 давало позитивну реакцію за даними ELISA), відбирали для злиття. З організму імунізованих тварин одержували спленоцити й створювали гібридами шляхом злиття сенсibilізованих спленоцитів з лінією клітин мієломи. Злиття мишачих селезінкових В-лімфоцитів здійснювали з лінією клітин мієломи SP2-0 (ATCC, Манассас, шт. Вірджинія) за допомогою добре відомих методів, описаних в Kohler і Milstein (Nature 256, 1975, стор. 495-497) і Harlow і Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

Клітини індукували до злиття, додаючи поліетиленгліколь. Гібридні клітини, які потім утворилися, клонували загальноприйнятим способом протягом 10-14 днів, дозволяючи клонам рости. Для первісної селекції клонів використовували обмежувач розведення. Клони гібридами, які продукують IgG, відбирали й оцінювали відносно специфічного зв'язування з A β ₁₋₄₂-пептидом за допомогою ELISA, і утворені клони, які продукували необхідні моноклональні антитіла, культивували.

Отримані в такий спосіб гібридами відбирали за допомогою хімічних агентів, висіваючи клітини в середовище для селекції, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (HAT).

Потім гібридами піддавали скринінгу відносно здатності продукувати моноклональні антитіла проти специфічних асоційованих з амілоїдом захворювань або порушень. Після ідентифікації маточного клону його пересівали 4 рази для гарантії моноклональності й давали гібриду стабілізуватися.

Гібридами, які продукують антитіла, що представляють інтерес, клонували, розмножували й зберігали в замороженому стані до подальшого застосування.

Визначали ізотип антитіл за допомогою набору для визначення ізотипів мишачих моноклональних антитіл, який надходить у продаж, і стабільні клони адаптували до безсироваткового середовища й поміщали в біореактор для виробництва антитіл.

Переважаюча гібридома продукувала моноклональне антитіло, що має ізотип IgG, більш переважно ізотип IgG1.

3.2 Одержання МАТ до надмолекулярних антигенних конструкцій, що містять пегіловані ПЕГ-

A β ₁₋₁₅, -A β ₄₋₁₁ і -A β ₂₉₋₄₀

Ліпосомні антигени одержували відповідно до методу, описаного в Nicolau і ін., PNAS, 99, 2002, стор. 2332-2337). Послідовності ПЕГ-A β ₁₋₁₅, -A β ₄₋₁₁ і -A β ₂₉₋₄₀ (фіг. 1) реконструювали в конструкції, що представляє собою ліпосоми з диміристоїлфосфатидилхоліну (DMPC), диміристоїлфосфатидилетаноламіну (DMPEA), диміристоїлфосфатидилгліцерину (DMPG) і холестерину (молярні співвідношення 0,9:0,1:0,1:0,7), які містили монофосфорильний ліпід А у концентрації 40 мг/мМ фосфоліпідів. Ці антигени й пегілований A β ₁₋₁₆ застосовували для імунізації мишей лінії C57BL/6 з 2-тижневими інтервалами. Кожним антигеном імунізували 10-12 тварин. Після 3-6 ревакцинацій мишей, у яких виявлені терапевтичні титри (коли розведення сироватки 1:5000 давало позитивну реакцію за даними ELISA), відбирали для злиття. З організму імунізованих тварин одержували спленоцити й створювали гібридами шляхом злиття сенсibiliзованих спленоцитів з лінією клітин мієломи. Злиття мишачих селезінкових В-лімфоцитів здійснювали з лінією клітин мієломи SP2-0 (ATCC, Манассас, шт. Вірджинія) за допомогою добре відомих методів, описаних в Kohler і Milstein (Nature 256, 1975, стор. 495-497) і Harlow і Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

Клітини індукували до злиття, додаючи поліетиленгліколь. Гібридні клітини, що утворилися, потім клонували загальноприйнятим способом, наприклад, використовуючи обмежувач розведення. Відбирали клони гібридами, які продукують IgG, й оцінювали відносно специфічного зв'язування з A β ₁₋₄₂-пептидом за допомогою ELISA, і утворені клони, які продукували необхідні моноклональні антитіла, культивували.

Отримані в такий спосіб гібридами відбирали за допомогою хімічних агентів, висіваючи клітини в середовище для селекції, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (HAT).

Потім гібридами піддавали скринінгу відносно здатності продукувати моноклональні антитіла проти специфічних асоційованих з амілоїдом захворювань або порушень. Гібридами, які продукують антитіла, що представляють інтерес, клонували, розмножували й зберігали в замороженому стані до подальшого застосування. Переважні гібридами продукували моноклональне антитіло, що має ізотип IgG, більш переважно ізотип IgG1.

Приклад 4: Специфічність розпізнавання амілоїдів антитілом mACI-24-Ab4

Для аналізу специфічності антитіла ACI-24-Ab4 різні концентрації попередньо отриманих фібрил амілоїду 1-42, 1-40 і 1-38 блотували на нітроцелюлозну мембрану Hybond ECL (фірма Amersham Biosciences). Після блокади 10 %-ним сухим молоком і 0,7 % Твін 20 мембрани інкубували з первинним антитілом у концентрації 20 мкг/мл протягом 2 год. при КТ. Після відмивання мембрани інкубували з кон'югованим з пероксидазою із хрому овечим антимишачим антитілом ізотипу IgG (фірма Amersham Biosciences) протягом 1 год. при КТ, відмивали й інкубували з хемілюмінісцентним розчином з наступним експонуванням мембрани на рентгенівську плівку.

Для оцінки зв'язування МАт (mACI-24-Ab4) з волокнами амілоїду β 1-42 попередньо формували протягом 7 днів при 37 °C волокна A β 1-42, 1-40 і 1-38 і блотували на мембрану. Для оцінки здатності до зв'язування використовували 20 мкг/мл антитіла й зв'язане антитіло виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою із хрому овечого антимишачого антитіла ізотипу IgG при 20-хвилинній експозиції.

Як можна продемонструвати за допомогою дот-блот-аналізу, зв'язування антитіла mACI-24-Ab4 з різними попередньо отриманими волокнами A β характеризувалося різною чутливістю. Антитіло проявляло найбільшу чутливість до зв'язування з волокнами A β ₁₋₄₂ у порівнянні з волокнами A β ₁₋₄₀ або A β ₁₋₃₈. Воно мало здатність виявляти принаймні 0,001 мкг волокон A β ₁₋₄₂, у той час як межа виявлення антитілом волокон A β ₁₋₄₀ становив принаймні 0,1 мкг, а волокон A β ₁₋₃₈ 1 мкг, це означає, що чутливість відносно цих типів амілоїдних волокон в 100-1000 разів нижче. Ці дані демонструють, що антитіло ACI-24-Ab4 мало принаймні в 100 разів більш високу чутливість у відношенні амілоїдної форми (1-42), яка, як відомо, стає нерозчинною в результаті зміни вторинної конформації і являє собою основну частину амілоїдних бляшок у головному мозку пацієнтів, які страждають від AD.

Приклад 5: Зв'язування AC-імунного моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 з різними видами амілоїдів при аналізі методами Вестерн-блотингу й дот-блотингу

Для вирішення питання про те, чи залежить зв'язування мишачого антитіла mACI-01-Ab7 C2 від нативної конформації A β , здійснювали порівняльний аналіз зв'язування лінеаризованого амілоїду за допомогою Вестерн-блотингу або нативного амілоїду за допомогою дот-блотингу (фіг. 2а й 2б)

Амілоїдні мономери одержували шляхом розчинення A β ₁₋₄₂-пептиду в HFIP і випарювання розчинника в атмосфері аргону. Висушену пептидну плівку зберігали при -80 °C до

застосування. Для одержання мономерів пептидну плівку ресуспендували в ДМСО до концентрації 2,75 мкг/мкл і розводили 3ФР до 1 мкг/мкл. Для одержання олігомерів висушену пептидну плівку ресуспендували в ДМСО до концентрації 5мМ, опромінювали ультразвуком і додавали 3ФР до одержання концентрації амілоїду 400мкМ після додавання ДСН до кінцевої концентрації 0,2 %. Після інкубації протягом 6 год. при 37 °С амілоїд розводили водою до кінцевої концентрації 100мкМ і інкубували протягом ще 18 год. при 37 °С. Амілоїдні олігомери осаджували за допомогою охолодженого на льоді 33 %-ного метанолу, 4 %-ного розчину оцтової кислоти протягом 1 год. при 4 °С, центрифугували при 16200×g протягом 10 хв і дебрис ресуспендували в 5мМ Na₂H₂PO₄, 35мМ NaCl, рН 7,4 до кінцевої концентрації 1 мкг/мкл. Для одержання волокон пептидну плівку розводили 50 мМ Трис-НСІ-буфером, одержуючи концентрацію амілоїду 1 мг/мл, і інкубували при 37 °С протягом 5 днів. Пробірки центрифугували при 10000×g протягом 5 хв і дебрис ресуспендували в 0,1М карбонатному буфері, рН 9,6 до досягнення концентрації 1 мкг/мкл.

Розводили 1 або 5 мкг мономерів, олігомерів або волокон у 3ФР і в буфері для завантаження й вносили в 12 % ДСН-ПААГ, і переносили гелі на нітроцелюлозні мембрани. В іншому варіанті по 3 або 1 мкг/мкл або 100 і 10 нг різних видів амілоїдів розводили в 3ФР і наносили краплями безпосередньо на нітроцелюлозну мембрану й мембрану сушили при КТ протягом 1 год. Після блокади протягом 30 хв із використанням розчину казеїну (фірма Vector) мембрани інкубували протягом 30 хв із антитілами mACI-01-Ab7 C2 або 6E10 (фірма Chemicon), розведеними до концентрації 1 мкг/мл розчином казеїну. Після трьох відмивань у розчині казеїну мембрани інкубували при КТ протягом 30 хв із міченим за допомогою HRP козячим антимішачим IgG (фірма Dako Cytomation), розведеним розчином казеїну, промивали тричі й здійснювали реакцію з використанням субстрату DAB (фірма Dako Cytomation).

При оцінці за допомогою дот-блотингу моноклональне мишаче антитіло mACI-01-Ab7 C2 специфічно зв'язувалося з мономерами, олігомерами й волокнами аналогічно антитілу 6E10, що застосовували як позитивний контроль. На противагу цьому антитіло mACI-01-Ab7C2 не виявляло лінеаризовані види амілоїдів при аналізі методом Вестерн-блотингу на відміну від антитіла 6E10, що ефективно розпізнавало лінеаризовані пептиди. Цей результат демонструє, що зв'язування mACI-01-Ab7 C2 з амілоїдом залежить від нативної конформації амілоїду.

Приклад 6: Взаємодія mACI-01Ab7 C2-Аβ₁₋₄₂

Взаємодію отриманого в результаті розвитку імунітету до АС (амілоїду в певній конформації) антитіла mACI-01-Ab7 C2 (m2) з амілоїдним пептидом вивчали за допомогою резонансу поверхневого плазмону. Оцінювали зв'язування мишачого антитіла mACI-01-Ab7 C2 або з мономерами, або з фібрилами Аβ₁₋₄₂.

Всі експерименти на основі резонансу поверхневого плазмону (SPR) здійснювали за допомогою пристрою Biacore X (фірма Biacore AB). Реагенти для іммобілізації (EDC, NHS і етаноламін), сенсорні чіпи CM5 і SA, а також робочий буфер і буфер для зразка HBS-EP одержували від фірми Biacore AB. Як буфер для сполучення використовували ацетат натрію (10 мМ, рН 5,0) для підвищення виходу реакції сполучення. Фібрилярний Аβ₁₋₄₂ (фірма Bachem) одержували, додаючи 3ФР-буфер до Аβ₁₋₄₂ до кінцевої концентрації 3 мг/мл і витримували в пробірках при 37 °С протягом 7 днів. Фібрилярний Аβ₁₋₄₂ зшивали із сенсорним чіпом CM5, з поверхнею якого був зв'язаний карбоксиметилдекстрановий матрикс. Біотинілований мономерний Аβ₁₋₄₂ (фірма Bachem) зшивали із сенсорним чіпом SA, що містить карбоксиметилдекстрановий матрикс із приєднаним за допомогою ковалентного зв'язку стрептавідином. Як правило, аналізували 4 або 5 концентрацій МАт, отриманих серійним розведенням у робочому буфері. Ін'єкції здійснювали, починаючи з найменшої концентрації, і пропускали й через проточну комірку (пк) 1, і через 2 при швидкості потоку 30 мкл/хв протягом 3 хв. Проточна комірка 2 була недериватизованою і відповіді віднімали з даних, отриманих у проточній комірці 1, для внесення виправлення на шум пристрою й значні зміни заломлюючого середовища. Після завершення ін'єкції поверхні негайно відмивали робочим буфером протягом 5 хв. Для відділення зв'язаного антитіла, що залишилося, від волокон Аβ₁₋₄₂ здійснювали регенерацію поверхні шляхом імпульсних ін'єкцій 10 мМ NaOH. Кінетичний аналіз здійснювали з використанням алгоритму чисельної інтеграції й глобального аналізу, використовуючи BIAevaluation 3.0. Криві, отримані при ін'єкціях різних концентрацій аналізованої речовини, сполучали й основні лінії приймали за нуль. При апроксимації кривими всі дані підганяли одночасно до гомогенного комплексу 1:1.

Встановлено, що зв'язування мишачого антитіла mACI-01-Ab7 C2 з амілоїдом, виявилось відносно сильним. Як видно з таблиці 2, специфічне зв'язування мишачого антитіла mACI-01-Ab7 C2 з іммобілізованими Аβ₁₋₄₂-фібрилами характеризувалося середніми значеннями константи асоціації (k_a) 3,8 × 10⁻⁴ М/с і константи дисоціації (k_d) 1,1 × 10⁻³ с⁻¹ і, як наслідок,

отриманим середнім значенням $KD\ 3,5 \times 10^{-8}$ М. Асоціація mACI-01-Ab7 C2 з мономерами A β була аналогічною або дещо більш швидкою й характеризувалася середнім значенням $k_a\ 1,6 \times 10^{-4}$ М/с, але дисоціація була істотно більш швидкою й характеризувалася значенням $KD\ 2,5 \times 10^{-7}$ М.

5

Таблиця 2

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

Приклад 7: Зв'язування моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 з амілоїдними волокнами

10 Аналіз молекулярного зв'язування антитіла з бічними гілками раніше сформованих волокон здійснювали за допомогою просвічувального електронного мікроскопу (TEM) з негативною контрастністю (фіг. 3а і 3б).

15 Антитіло mACI-01-Ab7 C2 зшивали із частинками колоїдного золота розміром 8 нм відповідно до методу, описаного в ^{4,5}. Для спільної інкубації з волокнами амілоїду 1-42 (A β_{1-42}) 6,65 мкМ волокон інкубували протягом 24 год. при КТ із міченим золотом антитілом у молярному співвідношенні 1:100. Потім 5 мкл зразка інкубували протягом 45 з на мідній сітці (меш 200), покритою плівкою з парлодію/С, яку безпосередньо перед цим піддавали електролюмінісценції, тричі промивали водою й один раз 2 %-ним свіжорозведеним і профільтованим ураніацетатом. Зразки фарбували 2 %-ним ураніацетатом протягом 15-20 с. Надлишок барвника на ґратах відсмоктували й потім сушили на повітрі. Готовили по трьох сітки для кожного зразка. Сітки аналізували за допомогою просвічувального електронного мікроскопу Hitachi 7000.

20 Моноклональне антитіло mACI-01-Ab7 C2 зв'язувалося безпосередньо з A β_{1-42} -волокнами. Важливо відзначити, що антитіло зв'язувалося не симетрично відносно осі окремих волокон, а зв'язувалося з конкретними, але не з усіма ділянками бічних гілок каркаса волокон. Імовірно, мішенню для антитіла є специфічні ділянки в бічних гілках. Можливим поясненням цього факту є специфічна вторинна структура, яка присутня тільки в цих конкретних бічних гілках. Ця гіпотезу підтверджували за допомогою Ямр-даних, які демонструють, що антитіло індукує перехід конформації й тому його зв'язування, очевидно, залежить від конформації амілоїдного волокна, що має β -складчасту структуру.

30 Приклад 8: Фракціонування шляхом ультрацентрифугування в градієнті густини

Здатність моноклональних антитіл інгібувати полімеризацію A β_{1-42} -волокон і порушувати агрегацію A β_{1-42} -волокон оцінювали за допомогою ультрацентрифугування в градієнті густини (Rzepeski і ін., 2004), що засновано на принципі розподілу пептидних волокон, що мають різний розмір, після інкубації з додаванням антитіл або без антитіл з наступним аналізом продуктів седиментації за допомогою ДСН-ПААГ на попередньо створеному градієнті (OptiPrep™). Очевидною перевагою такого методу є одночасний аналіз популяції попередньо сформованих A β -волокон, здатності спільно інкубованих антитіл порушувати агрегацію й інгібувати агрегацію, а також зв'язування антитіл з волокнами.

40 Всі моноклональні антитіла до A β_{1-16} (mACI-01-Ab7 C2), A $\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (mACI-02-Ab6), A β_{1-15} (mACI-24-Ab4), A β_{22-35} (mACI-11-Ab9) і A β_{29-40} (mACI-12-Ab11) аналізували відносно здатності порушувати агрегацію, у той час як здатність інгібувати агрегацію вивчали тільки для антитіл mACI-02-Ab6, mACI-24-Ab4 і mACI-01-Ab7 C2.

45 Для інгібування агрегації A β_{1-42} інкубували мономери A β_{1-42} з МАт у двох різних молярних співвідношеннях (молярний вміст мономеру A β_{1-42} в 30-100 разів вище, ніж МАт) при використанні кінцевої концентрації A β 50 мкМ. Після інкубації протягом 24 год. при 37 °С зразки

нашаровували на переривчастий градієнт Optiprep™ і пробірки обертали при 259000×g протягом 3 год. при 4 °С. Збирали 15 фракцій (по 140 мкл кожна), фракція 1 являла собою фракцію з найменшою густиною, отриману на вершині градієнта, а фракція 15 являла собою найбільш густу фракцію, отриману в нижній частині (на дні) градієнта. Збирали також дебріс.

5 Об'єднані фракції аналізували за допомогою ДСН-ПААГ з фарбуванням сріблом. Для аналізів інгібування використовували концентрацію Аβ₁₋₄₂, що була в 5 разів нижче, ніж для аналізів порушення агрегації, що дозволяло знижувати кінетику амілоїдної агрегації й проводити вимірювання в межах лінійної фази.

Для аналізу порушення агрегації раніше сформованих Аβ₁₋₄₂-фібрил при спільній інкубації з МАт (при двох різних молярних співвідношеннях 1:30 і 1:100, МАт + мономер Аβ₁₋₄₂ при кінцевій концентрації Аβ 246мкМ) здійснювали інкубацію зразків протягом 24 год. при 37 °С. Через 24 год. зразки фракціонували ультрацентрифугуванням і розділяли за допомогою ДСН-ПААГ відповідно до описаного вище й розробленого раніше методу (Rzepecki і ін., 2004).

8.1. Аналіз інгібування агрегації Аβ₁₋₄₂

15 Було встановлено, що без додавання МАт агрегація Аβ-пептиду відбувалася після 24-годинної інкубації й найбільша кількість білка була виявлена у фракціях 13-15, що свідчило про повну полімеризацію мономерів Аβ-пептиду. Успішне й істотне інгібування агрегації повинно приводити до утворення фібрил меншого розміру або полімерного розчинного білка β-амілоїду (Аβ), які повинні бути присутні у фракціях з більш низькою густиною (10-13). Саме такий зсув

20 смуг можна виявити при аналізі агрегації при використанні mACI-01-Ab7 C2, що свідчить про розподіл Аβ-пептиду у фракціях 11, 12 і 13.

Це було підтверджено в другому експерименті, у якому встановлено, що mACI-01-Ab7 C2 також викликало зсув більшості смуг (найбільш інтенсивна смуга) від 14 до 13 фракції й приводило до вираженої солюбілізації смуг у фракціях від 14 до дебрісу. Ці результати свідчать

25 про те, що mACI-01-Ab7 C2 має виражену здатність інгібувати полімеризацію мономерів Аβ-пептиду з утворенням волокон і свідчать про специфічне зв'язування з Аβ-волокнами (у фракції 13).

Аналогічні дані отримані при використанні антитіл mACI-24-Ab4 і mACI-02-Ab6. Без додавання МАт агрегація Аβ-пептиду відбувалася після 24-годинної інкубації й найбільша

30 кількість білка була виявлена у фракціях від 13 до дебрісу (дебріс, дуже невелика кількість у фракції 12), що свідчило про повну полімеризацію мономерів Аβ-пептиду. Успішне й істотне інгібування агрегації повинно приводити до утворення волокон меншого розміру або полімерного розчинного білка амілоїду β (Аβ), які повинні бути присутні у фракціях з більш низькою густиною. При аналізі агрегації встановлено, що антитіло mACI-24-Ab4 викликало зсув

35 більшості смуг (найбільш інтенсивна смуга) від 13 до 11 фракції й 12 і приводило до вираженої солюбілізації смуг у фракціях від 13 до дебрісу, у той час як mACI-02-Ab6 викликало зсув смуг від 13 до 10 фракції, але також повністю інгібувало утворення більших волокон (які знаходяться у фракціях з 13 до дебрісу). Ці результати свідчать про те, що й mACI-24-Ab4, і mACI-02-Ab6

40 мають виражену здатність інгібувати полімеризацію мономерів Аβ-пептиду з утворенням волокон і свідчать про специфічне зв'язування з волокнами Аβ? (у фракціях 11 і 12).

На відміну від цього, аналіз агрегації з використанням mACI-11-Ab9 у молярному співвідношенні 1:30 продемонстрував наявність більших агрегатів у фракціях з 12 по 15 і в дебрісі. У присутності mACI-12-Ab11 у молярному співвідношенні 1:30 агрегати виявлені у

45 фракціях з 11 по 15 і дебрісі, але найбільш сильний сигнал виявлений у фракціях 11 і 12. Це означає, що mACI-01-Ab7 C2 і mACI-24-Ab4 мають більше виражену здатність інгібувати полімеризацію мономерів Аβ-пептиду з утворенням волокон. mACI-12-Ab11 мало істотно більш низьку інгібувальну активність, чим mACI-01-Ab7 C2, для одержання цієї слабкої інгібувальної активності потрібно в три рази більш високе молярне співвідношення. Невелике інгібування можна виявити також при порівнянні з mACI-11-Ab9, що не мало здатність інгібувати агрегацію

50 волокон Аβ-пептиду. Усе МАт характеризуються специфічним зв'язуванням з волокнами Аβ (mACI-01-Ab7 C2 у фракціях 11+12; mACI-11-Ab9 у фракції 12 і слабке зв'язування у фракції 13; mACI-12-Ab11 у фракціях 11 і 12).

У всіх аналізах інгібування пептид був виявлений у нижніх фракціях. Незв'язане МАт (37 кДа, 95 кДа й більше 120 кДа), імовірно, перебувало у верхній половині градієнта (фракції 3-9 і 4-8

55 відповідно).

8.2. Аналіз порушення агрегації волокон Аβ₁₋₄₂

Через неповну полімеризацію волокна розподіл тільки (за відсутності антитіла) Аβ₁₋₄₂-фібрил було виявлено в більшому діапазоні фракцій (11-15). Тому демонстрація здатності до успішного й значного порушення антитілами агрегації при спільній інкубації з раніше сформованими

60 волокнами є більше важкою в порівнянні з аналізом агрегації. Тільки зсув більшої частини

волокон у бік фракцій меншої густини, але які ще знаходяться у діапазоні фракцій, що відповідають тільки амілоїдам, може свідчити про здатності порушувати агрегацію; основна смуга, що відповідає тільки амілоїдам, являє собою фракцію 12. Додавання mACI-01-Ab7 C2 у молярному співвідношенні 1:100 не приводило до зсуву амілоїдних волокон у бік фракцій з більш низькою густиною (усе ще фракції 11-15), але викликало зсув більш сильного сигналу із фракції 12 в 11-у фракцію при порівнянні з тільки амілоїдами. Незважаючи на невідповідні оптимальним умови, зв'язані з неповним формуванням волокна, при використанні mACI-01-Ab7 C2 встановлений невисокий рівень активності, але який можна виявити, відносно порушення агрегації. На противагу цьому, спільна інкубація раніше сформованих $A\beta_{1-42}$ -волокон з mACI-02-Ab6 продемонструвала відсутність зсуву смуг у бік фракції з більш низькою густиною при інкубації з використанням такого ж молярного співвідношення пептид:антитіло, що й при застосуванні mACI-01-Ab7 C2. Тільки при використанні в три рази більш високого співвідношення 1:30, було виявлено зсув амілоїдних волокон із фракцій 12-15 (тільки амілоїд без спільної інкубації з антитілом) у фракції 11-15. Таким чином, очевидно, mACI-01-Ab7 C2 має дещо більш виражену здатність порушувати агрегацію, чим mACI-02-Ab6.

Виявлення смуг, що відповідають МАт, у фракціях у нижній половині градієнта демонструє зв'язування mACI-02-Ab6 і mACI-01-Ab7 C2 з $A\beta_{1-42}$ -фібрилами (для обох МАт фракції 11-15).

Здатність mACI-01-Ab7 C2 порушувати агрегацію можна підтвердити за допомогою додаткового експерименту, у якому можна продемонструвати повну полімеризацію волокна за розподілом $A\beta_{1-42}$ -фібрил за відсутності антитіла у фракціях з 13 до Р (дебрис). У даних дослідженнях зсув волокон у фракції з більш низькою густиною свідчить про здатності антитіла порушувати агрегацію при спільній інкубації з раніше сформованими волокнами. Додавання mACI-01-Ab7 C2 у молярному співвідношенні 1:100 приводило до зсуву більшої частини амілоїдних волокон з 13-й фракції в 12-у фракцію й, крім того, до зсуву смуги з найнижчою густиною з 13-ої фракції у бік 11-ої фракції. Таким чином, mACI-01-Ab7 C2 також характеризується вираженою активністю відносно порушення агрегації.

Виявлення смуг, що відповідають МАт, у фракціях у нижній половині градієнта демонструє зв'язування mACI-01-Ab7 C2 з $A\beta_{1-42}$ -фібрилами (фракції з 11 до Р), у той час як смуги, що відповідають МАт у фракціях 4-7, відповідають незв'язаному антитілу.

Для узагальнення цих результатів слід було б переконливо продемонструвати, що моноклональне антитіло mACI-01-Ab7 C2, мішенню якого є пептид амілоїду $A\beta$, зв'язується з раніше сформованими волокнами й має здатність інгібувати *in vitro* агрегацію мономерних $A\beta$ -пептидів, що приводить до утворення волокон, і порушувати агрегацію раніше сформованих волокон.

Аналогічні результати отримані при використанні mACI-24-Ab4. Аналогічно до даних, отриманих при аналізі агрегації, повну полімеризацію можна виявляти за розподілом тільки $A\beta_{1-42}$ -фібрил у фракціях з 12 до Р (дебрис). У даних дослідженнях зсув волокон у фракції з більш низькою густиною може свідчити про здатність антитіла порушувати агрегацію при спільній інкубації з раніше сформованими волокнами. Додавання mACI-24-Ab4 у молярному співвідношенні 1:100 приводило до зсуву максимуму амілоїдних волокон з 12-ої фракції в 11-у фракцію. Таким чином, mACI-24-Ab4 також характеризується вираженою активністю відносно порушення агрегації.

Приклад 9: Флуоресцентний аналіз, застосовуваний для оцінки інгібування агрегації філаментів $A\beta_{1-42}$ і порушення агрегації раніше сформованих філаментів $A\beta_{1-42}$ при спільній інкубації з МАт

Флуоресцентний BIS-ANS-аналіз

Для оцінки інгувальної активності МАт використовували флуоресцентний аналіз BIS-ANS (LeVine, 2002), що дозволяє здійснювати специфічне виявлення популяції мономерних або нефібрилярних філаментів $A\beta_{1-42}$. Перед флуоресцентним аналізом мономерні $A\beta_{1-42}$ попередньо інкубували або з буфером як контролем, або з МАт (молярне співвідношення МАт до $A\beta_{1-42}$ -пептиду 1:100) протягом 14 год. при 37 °С. Відносні одиниці флуоресценції визначали автоматично й результати виражали у вигляді змін щодо контролю у відсотках.

Встановлено, що mACI-02-Ab6 мало слабку інгібувальну здатність у порівнянні з контролем ($125,8 \pm 28,5$ % відносно $100 \pm 29,5$ %). mACI-01-Ab7 C2, імовірно, мало слабку активність ($108,0 \pm 30,0$ %) і не мало переваги в порівнянні з контролем, що виявлено при використанні МАт mACI-11-Ab9 і mACI-12-Ab11 ($93,5 \pm 21,9$ % і $73,2 \pm 47,7$ %). Цей результат підтвердив дані, отримані за допомогою ультрацентрифугування, що свідчать про те, що mACI-01-Ab7 C2 має більш високу інгібувальну активність, ніж mACI-11-Ab9 і mACI-12-Ab11.

Приклад 10: Флуоресцентний аналіз із використанням тіофлавіну Т (Th-T)

Для оцінки здатності МАт як інгібувати агрегацію, так і порушувати агрегацію,

використовували флуоресцентний аналіз із використанням тіофлавіну Т (Th-T), що специфічно зв'язується з молекулами фібрилярного $A\beta_{1-42}$ і інтенсивність наступної флуоресцентної емісії якого корелює з кількістю філаментів $A\beta_{1-42}$, присутніх у розчині.

Перед флуоресцентним аналізом мономери $A\beta_{1-42}$ попередньо інкубували або з буфером (контроль), або з МАт (молярне співвідношення МАт і пептиду $A\beta_{1-42}$ 1:100) протягом 48 год. при 37 °С. Відносні флуоресцентні одиниці підраховували автоматично, і результати виражали у вигляді змін щодо контролю у відсотках. Встановлено, що mACI-01-Ab7 C2 мало виражену здатність до інгібування в порівнянні з контролем (порівн. $11,03 \pm 20,7\%$ і $100 \pm 40,5\%$). Цей результат підтвердив дані, отримані за допомогою ультрацентрифугування, які також свідчать про інгібувальну активність mACI-01-Ab7 C2.

Для оцінки здатності МАт порушувати агрегацію застосовували флуоресцентний аналіз із використанням тіофлавіну Т (Th-T), що специфічно зв'язується з молекулами фібрилярного $A\beta_{1-42}$ і інтенсивність наступної флуоресцентної емісії якого корелює з кількістю філаментів $A\beta_{1-42}$, присутніх у розчині. Перед проведенням аналізу попередньо протягом 7 днів (при 37°З у 3ФР, рН 7,1) формували волокно $A\beta$ і потім спільно інкубували з МАт або буфером (негативний контроль) протягом 24 год. при 37 °С у молярному співвідношенні 1:100 (МАт: $A\beta_{1-42}$). Відносні флуоресцентні одиниці підраховували автоматично за допомогою рідера для мікропланшетів для ELISA, і результати виражали у вигляді змін відносно контролю у відсотках.

В двох незалежних експериментах з оцінки здатності порушувати агрегацію з використанням Th-T також було встановлено, що mACI-01-Ab7 C2 мало дуже високу здатність порушувати агрегацію в порівнянні з контролем $35 \pm 11\%$ і $64,57 \pm 13,58\%$ (у порівнянні з $100,0 \pm 15,37\%$) відповідно, що узгоджується з даними, отриманими за допомогою ультрацентрифугування.

За допомогою Th-T-аналізу встановлено, що mACI-24-Ab4 також має виражену здатність порушувати агрегацію ($62,99 \pm 10,34\%$ у порівнянні з $100,0 \pm 10,03\%$; $p < 0,0001$).

mACI-11-Ab9 мало трохи меншу активність ($28 \pm 14\%$), у той час як ACI-02-Ab6 і ACI-12-Ab11 не мали помітну здатність порушувати агрегацію ($17 \pm 12\%$ і $13 \pm 11\%$ відповідно).

Узагальнюючи дані, отримані за допомогою ультрацентрифугування й флуоресцентних аналізів, можна зробити висновок про те, що mACI-01-Ab7 C2, mACI-01-Ab6 і mACI-24-Ab4 мають біфункціональність, інгібуючи агрегацію волокна й укорочуючи раніше сформовані $A\beta_{1-42}$ -філаменти в експерименті із застосуванням центрифугування, що було підтверджено за допомогою флуоресцентного аналізу. Крім того, в експерименті із застосуванням центрифугування продемонстроване специфічне зв'язування МАт з амілоїдними волокнами.

За допомогою ультрацентрифугування встановлено, що mACI-11-Ab9 мало істотно більш низьку здатність до інгібування в порівнянні з mACI-01-Ab7 C2 навіть при використанні в 3 рази більш високої концентрації, що підтверджено за допомогою BIS-ANS-аналізу. При вивченні за допомогою центрифугування й Th-T-аналізу здатності порушувати агрегацію встановлено, що mACI-01-Ab7 C2 мало здатність укорочувати раніше сформовані $A\beta_{1-42}$ -філаменти. При використанні в 3 рази більш високої концентрації в експерименті із застосуванням центрифугування mACI-02-Ab6 також забезпечувало позитивний результат в обох аналізах, але він був істотно більш вираженим в експерименті із застосуванням центрифугування.

З вищенаведених результатів очевидно, що mACI-01-Ab7 C2 і mACI-02-Ab6 являють собою єдині антитіла, які при взаємодії з $A\beta_{1-42}$ -філаментами мають активність, яку можна назвати біфункціональною, тобто яка викликає інгібування агрегації й порушення агрегації раніше сформованих волокон.

Приклад 11: Характеризація за допомогою ЯМР- і флуоресцентного аналізу взаємодії моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 з міченим за допомогою ^{13}C пептидом β -амілоїду 1-42

Для оцінки можливого механізму, за допомогою якого МАт солюбілізує раніше сформовані волокна або інгібує формування волокон, здійснювали паралельний експеримент за типом "голова-до-голови" з використанням флуоресцентного Th-T-аналізу і ЯМР-спектроскопії твердого тіла міченого за допомогою $\text{U-}^{13}\text{C}$ Tyr10- і Val12 пептиду β -амілоїду 1-42 (фіг. 4). Таким чином, метою цього дослідження було виявлення переходу β -складчастої конформації в пептиді β -амілоїду за допомогою Ямр-спектроскопії твердого тіла й у присутності моноклонального антитіла й безпосереднє порівняння отриманих результатів з даними про здатності порушувати агрегацію, які були отримані за допомогою флуоресцентного Th-T-аналізу.

ЯМР-спектроскопія твердого тіла не тільки дозволяє виявляти перехід вторинної структури, але також дає можливість виявити локалізацію доменів $A\beta_{1-42}$ -пептиду, у яких переважає структурний перехід. Встановлено, що ЯМР-спектроскопію твердого тіла можна застосовувати для вирішення проблеми, зв'язаної з визначенням структури $A\beta_{1-42}$ -волокон (Petkova і ін., 2004, Petkova і ін., 2002). Зокрема, наявність кореляції між хімічним зсувом $^{13}\text{C}_\alpha$ і $^{13}\text{C}_\beta$ і вторинною

структурою (Cornilescu і ін., 1999, Luca і ін., 2001, Iwadata і ін., 1999) є важливим інструментом для оцінки змін вторинної структури усередині пептиду.

Синтез пептиду, міченого шляхом включення попередньо міченого за допомогою ^{13}C валіну в положення 12 (^{12}Val) і попередньо міченого за допомогою ^{13}C тирозину в положення 10 (^{10}Tyr), здійснювали за допомогою протоколу синтезу, що передбачає застосування Fmoc. Ідентичність і чистоту пептиду підтверджували за допомогою MALDI-мас-спектроскопії. Мічений β -амілоїдний пептид (1-42) застосовували для одержання волокон шляхом інкубації розчину пептиду в 3фр-буфері протягом 1 тижня при 37 °С. Основну проблему, зв'язану з поганою розчинністю β -амілоїдного пептиду в 3фр-буфері, можна вирішувати в такий спосіб: для розчинення β -амілоїдного пептиду значення рН 3фр-буфера тимчасово підвищували за допомогою дуже невеликої кількості аміаку. Вихідне значення рН 3фр-буфера повертали шляхом інкубації зразка в присутності більшої партії 3ФР, ґрунтуючись на характеристиках летючості аміаку.

Для оцінки впливу антитіл, що порушують β -складчасту конформацію, розчин волокон інкубували з антитілом протягом 24 год. при 37 °С при проведенні як ЯМР-, так і Th-T-аналізу. Для порівняння в реальному часі аліквоту того самого розчину застосовували для флуоресцентного Th-T-аналізу й розчин, що залишився, ліофілізували для Ямр-дослідження.

Після того, як спочатку за допомогою флуоресцентного Th-T-аналізу було проведене вивчення здатності mACI-01-Ab7 C2 порушувати агрегацію при спільній інкубації з раніше сформованими міченими за допомогою ^{13}C амілоїдними β -волокнами, було встановлено, що МАт порушує агрегацію волокон на 38 %. Після цього здійснювали аналіз Ямр-спектрів.

Для оцінки відмінностей між інкубацією зі 3ФР (контроль) і МАт кожний спектр піддавали деконволюції за допомогою програми FEAkFit (<http://www.systat.com/-products/FEAkFit>). Лінії підганяли з необхідною точністю, застосовуючи процедуру апроксимації змішаного Лоренц/Гаусовського типу, отримані результати представлені на фіг. 4. Ці результати узагальнені в таблиці 3, при цьому найбільш виражена відмінність полягала в інтегральних інтенсивностях для двох популяцій, які необхідні для апроксимації подвійного піку в діапазоні 30-33 част./млн. Пік при 33 част./млн відповідав бета-складчастій конформації волокон, а пік при 30 част./млн відповідав конформації у вигляді довільної спіралі. Для зразка, що інкубували в 3ФР, виявлений найбільш високий вміст мітки в бета-складчастій конформації (81,7 %) (фіг. 4, верхня частина), що знижувалося при інкубації зразка з mACI-01-Ab7 C2 (53,5 %) (фіг. 4, нижня частина). Зниження популяції бета-складчастої конформації у бік конформації у вигляді довільної спіралі, встановлене в досліді з використанням $\text{Va1-}^{12}\text{C}\beta$, становило порядку 35 % і, таким чином, добре співпадало з результатами, отриманими за допомогою флуоресценції.

Таблиця 3. Порівняння апроксимованих параметрів для двох конформацій $\text{Va1-}^{12}\text{C}\beta$. Апроксимовані хімічні зсуви для двох конформацій повністю аналогічні, але інтегральні інтенсивності дуже сильно відрізняються, відображаючи зниження рівня вихідної бета-складчастої конформації приблизно на 35 % (1-(53,5/81,7)). Це дуже добре узгоджується зі значенням, отриманим за допомогою флуоресцентного аналізу.

Таблиця 3

Порівняння апроксимованих параметрів для двох конформацій $\text{Va1-}^{12}\text{C}\beta$.

Резонанс	3ФР			MACI-01-Ab7 C2		
	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% інтегральної інтенсивності	δ ISO (част./млн)	FWHM (Гц)	% інтегральної інтенсивності
Va1-C β - бета-складчаста конформація	32,60	479	81,7	30,09	366	53,5
Va1-C β - конформація у вигляді довільної спіралі	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

Узагальнюючи ці результати, можна переконливо продемонструвати, що моноклональне антитіло mACI-01-Ab7 C2, мішенню якого є N-кінцева 1-16-ділянка амілоїдного А β -пептиду, зв'язується з раніше сформованими волокнами й має здатність інгібувати in vitro агрегацію мономерних А β -пептидів, що приводить до утворення волокон, і порушувати агрегацію раніше

формованих волокон, що було продемонстровано в експерименті з ультрацентрифугування в градієнті густини, а також за допомогою флуоресцентного Th-T-аналізу. Крім того, шляхом зв'язування цього антитіла з раніше сформованими волокнами можна індукувати перехід більшої частини бета-складчастої конформації у вторинну конформацію у вигляді довільної спіралі в районі Val12. Це може являти собою можливий механізм, за допомогою якого волокна можна солюбілізувати шляхом зв'язування моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2, оскільки також детальний аналіз піку Val-¹²Cβ дозволив виявити зниження компонента з бета-складчастою конформацією на 35 %, що добре узгоджується з даними флуоресцентного аналізу (38 %).

Приклад 12: Функціональна активність mACI-01-Ab7 C2 у відношенні амілоїдних волокон
12.1 Модифікація конформації Aβ₁₋₄₂-волокон і ініціація порушення агрегації після зв'язування антитіла mACI-01-Ab7 C2

Для оцінки механізму, за допомогою якого антитіло порушує агрегацію сформованих Aβ₁₋₄₂-волокон здійснювали порівняння за типом "голова-до-голови" результатів, отриманих з використанням флуоресцентного тіофлавін-T- (Th-T)-аналізу, що проводили для оцінки порушення агрегації, і аналізу за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР-спектроскопія твердого тіла) міченого за допомогою U-¹³C тирозину¹⁰ і міченого за допомогою валіну¹² пептиду Aβ₁₋₄₂, який застосовували для визначення вторинної конформації. Антитіло солюбілізувало 35,4 % раніше сформованих Aβ₁₋₄₂-волокон і в той же час індукувало зсув вторинної конформації від бета-складчастої конформації у бік конформації у вигляді довільних спіралей. Зниження популяції бета-складчастої конформації у бік конформації у вигляді довільної спіралі, становило порядку 35 % і, таким чином, добре співпадало з результатами, отриманими за допомогою флуоресцентного Th-T-аналізу. Ці дані свідчать про те, що зв'язування антитіла ініціювало перехід вторинної структури, що, можливо, викликало дестабілізацію паралельного міжмолекулярного пристрою бета-складок, впливаючи на розщеплення подовжених волокон на більше дрібні фрагменти.

12.2 Залежна від конформації афінність до зв'язування антитіла mACI-01-Ab7 C2

Оскільки з науковій літератури добре відомо, що частину енергії зв'язування антитіло-антиген можна використовувати для залежної від енергії модифікації конформації антигену⁶, здійснювали порівняльний експеримент з оцінки афінності зв'язування антитіла mACI-01-Ab7 C2 з повним білком Aβ₁₋₄₂ і з більш коротким пептидом, який складається з 9 амінокислот, що містив епітоп для антитіла. Для цього порівняння афінності антитіла mACI-01-Ab7 C2 застосовували ELISA з використанням біотинілованих пептидів, що перекривають повну амінокислотну послідовність епітопу mACI-01-Ab7 C2 (амінокислоти 13-21 послідовності Aβ₁₋₄₂, створені на фірмі Mimotopes і вступники в продаж від фірми ANAWA Trading SA), і біотинілованого повного пептиду Aβ₁₋₄₂ (фірма Bachem). Аналіз здійснювали відповідно до інструкцій виробника (фірма Mimotopes). Афінність до зв'язування антитіла з пептидом, що містить специфічний епітоп (амінокислоти 13-21 послідовності Aβ₁₋₄₂), виявилася на 38,40 % вище в порівнянні з афінністю до зв'язування з повним білком Aβ₁₋₄₂. Таким чином, можна припустити, що відмінності в енергії афінності зв'язування використалося для зв'язаного з поглинанням енергії переходу вторинної структури амілоїдного білка для презентації антигену в більш доступному положенні для зв'язку з антитілом. Це може пояснити, чому афінність антитіла є більш низькою для нативної (повний амілоїдний білок), ніж для виділеної субодиниці.

Приклад 13: Специфічне для конформації зв'язування mACI-01-Ab7 C2 з різними класами амілоїдного білка

Для оцінки специфічності mACI-01-Ab7 C2 до амілоїдного білка на різних стадіях його полімеризації здійснювали аналіз мономерних і полімерних розчинних амілоїдів, насамперед білка амілоїду β (Aβ) і фібрилярного амілоїду, з використанням планшетів для ELISA, сенсibilізованих вказаними різними стадіями полімерного бета-амілоїду. Мономери одержували відповідно до модифікованого опублікованого методу⁷, полімерний розчинний амілоїд, насамперед амілоїд β (Aβ) відповідно до методу⁸, а волокна одержували інкубацією амілоїду (фірма Bachem, Швейцарія) з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл Трис/HCl, pH 7,4 при 37 °C протягом 5 днів з наступною стадією центрифугування (10000 об/хв протягом 5 хв). Після цього амілоїдними полімерами сенсibilізували планшети для ELISA з використанням кінцевої концентрації 55 мкг/мл, і афінність до зв'язування визначали за допомогою ELISA з використанням антимишачого моноклонального антитіла у вигляді IgG (фірма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), міченого лужною фосфатазою. Антитіло зв'язувалося з більш високою афінністю з полімерним розчинним білком амілоїду β (Aβ) (IC₅₀=2,53нМ), ніж з волокнами (IC₅₀=5,27нМ), і з найменшою афінністю з мономерами (IC₅₀=8,3нМ). Ці результати демонструють, що на зв'язування антитіла впливає крім епітопу конформація різних амілоїдних

агрегатів.

Приклад 14: Картування епітопів моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2

Картування епітопів моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 здійснювали за допомогою ELISA, використовуючи три різні пептидні бібліотеки. Одна бібліотека містила в цілому 33 біотинілованих пептиду, що перекривають повну амінокислотну (ак) послідовність A β ₁₋₄₂, (створену на фірмі Mimotopes і вступник у продаж від фірми ANAWA Trading SA), друга бібліотека містила біотиніловані пептиди, у ній використовували пептид 12 (ак 12-20 A β) з першої пептидної бібліотеки й заміняли кожну амінокислоту в послідовності аланіном (див. таблицю 4 нижче), а третя бібліотека містила біотиніловані пептиди 13, 14 або 15 (ак 13-21, 14-22 або 15-23 A β) і в ній заміняли в кожному випадку останні амінокислоти на аланін або на гліцин як у випадку ак 21, що вже являла собою аланін (див. таблицю 5 нижче). Як позитивний контроль використовували біотинілований повний пептид A β ₁₋₄₂ (фірма Bachem). Картування епітопів здійснювали відповідно до інструкцій виробника (фірма Mimotopes). Загалом, метод полягав у наступному: сенсibilізовані стрептавідином планшети (фірма NUNC) блокували 0,1 % БСА в ЗФР протягом ночі при 4 °С. Після промивання ЗФР- 0,05 % Твін 20 планшети сенсibilізували протягом 1 год. при КТ різними пептидами з бібліотеки, розведеними в 0,1 % БСА, 0,1 % азиду натрію в ЗФР до кінцевої концентрації 10мкм. Після відмивання планшети інкубували протягом 1 год. при КТ із антитілом mACI-01-Ab7 C2 або із застосовуваним як контроль ізотипу мишачим антитілом у вигляді IgG2b, розведеним до концентрації 10 мкг/мл в 2 % БСА, 0,1 % азиду натрію в ЗФР. Планшети знову промивали й інкубували з кон'югованим з лужною фосфатазою козячим антимишачим IgG протягом 1 год. при КТ. Після остаточного промивання планшети інкубували із субстратом фосфатази (pNPP) і зчитували при 405 нм за допомогою планшет-рідера для ELISA.

Встановлено, що моноклональне антитіло mACI-01-Ab7 C2 зв'язувалося специфічно з пептидами 12, 13, 14 і 15 з першої пептидної бібліотеки. Ці 4 пептиди містили ак 12-20 (VHHQKLTVFF), 13-21 (HHQKLTVFFA), 14-22 (HQKLTVFFAE) і 15-23 (QKLTVFFAED) A β ₁₋₄₂, це дозволяло припустити, що епітоп знаходиться в 12-23-ділянці A β . Другу бібліотеку, створену шляхом заміни на аланін, використовували для визначення ак, що мають вирішальне значення для зв'язування з пептидом 12-20 (VHHQKLTVFF). Зв'язування антитіла mACI-01-Ab7 C2 практично повністю елімінувалося при заміні ак 16, 17, 19 або 20 на аланін, ці результати свідчать про те, що ці ак мають найвищою мірою вирішальне значення для зв'язування антитіла з A β . Зв'язування антитіла mACI-01-Ab7 C2 частково знижувалося, коли заміняли ак 15 і 18.

Зв'язування також практично повністю елімінувалося, коли ак 14 заміняли на аланін, що свідчить про те, що ак 14 також дуже важлива для зв'язування.

І, нарешті, третю бібліотеку застосовували для з'ясування питання про те, чи мають вирішальне значення для зв'язування з епітопом ак 21, 22 або 23. Зв'язування антитіла з ак 15-23 знижувалося, коли ак 23 заміняли на аланін, що свідчить про важливість ак 23 для зв'язування. Зв'язування частково знижувалося при заміні ак 21 на гліцин і злегка знижувалося при заміні ак 22 на аланін.

Таблиця 4

Перелік пептидів, застосовуваних у другій бібліотеці

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
ак по.	12	13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20

Ак, важливі для зв'язування, позначені курсивом і підкреслені, а ак, що мають найвищою мірою вирішальне значення для зв'язування, позначені курсивом і виділені жирним шрифтом і підкреслені

Перелік пептидів, які застосовують у третій бібліотеці

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

Ак, важливі для зв'язування, позначені курсивом і підкреслені, а ак, що мають найвищою мірою вирішальне значення для зв'язування, позначені курсивом і виділені жирним шрифтом і підкреслені

Приклад 15: Вплив пасивної імунізації з використанням mACI-01-Ab7 C2 на амілоїдну завантаження головного мозку мишей, що несуть один трансген hAPP

Для оцінки *in vivo* здатності моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 зв'язуватися й очищати головний мозок від розчинного амілоїду для дослідів з пасивної імунізації різними дозами використовували 6-місячних мишей, що несуть один hAPP⁹, підібраних за статтю й віком. Завантаження розчинним амілоїдом аналізували наприкінці досліду, вилучаючи головний мозок тварин і здійснюючи специфічний для Aβ₁₋₄₀ і Aβ₁₋₄₂ ELISA (фірма TGC, Німеччина). 8-13 тваринам в групі вводили з тижневим інтервалом дві ін'єкції по 100, 300 і 1000 мкг моноклонального антитіла в 200 мкл ЗФР, контрольним тваринам вводили шляхом ін'єкції тільки ЗФР. Через 1 день після другої ін'єкції тварин умертвляли для здійснення біохімічного аналізу фракції розчинного амілоїду. Для кількісної оцінки людського Aβ₁₋₄₀ і людського Aβ₁₋₄₂ у розчинній фракції гомогенатів головного мозку та/або спинномозкової рідини (CSF), використовували набори для твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA), які надходять у продаж (h Amyloid β 40 або β 42 ELISA, високочутливий, фірма TGC, Швейцарія). ELISA здійснювали відповідно до протоколу виробника. Загалом, метод полягав у наступному: стандарти (розведення синтетичного Aβ₁₋₄₀ або Aβ₁₋₄₂) і зразки готували в 96-лунковому поліпропіленовому планшеті, що не мав здатність зв'язуватися з білком (фірма Greiner, Німеччина). Розведення стандартів з кінцевими концентраціями 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 і 15,6 пг/мл і зразків готували за допомогою розріджувача для зразків, що входив зі склад набору для ELISA, до кінцевого об'єму 60 мкл. Оскільки рівні амілоїдів підвищуються в міру збільшення віку мишей і оскільки для надійної оцінки необхідно здійснювати аналіз зразків у межах лінійної ділянки стандартної кривої, зразки для аналізу Aβ₁₋₄₀ розводили в співвідношенні 2:3, а зразки Aβ₁₋₄₂ аналізували без розведення.

Зразки, стандарти й контрольні проби (по 50 мкл) додавали в сенсibilізований антитілом до Aβ полістирольний планшет (іммобілізоване антитіло, що вибірково розпізнає C-кінець антигену), а також кон'югатом селективного антитіла до Aβ (біотиніловане ідентифікуюче антитіло) і інкубували протягом ночі при 4 °C для того, щоб відбулося формування комплексу антитіло-амілоїд-антитіло. Наступного дня додавали кон'югат стрептавідин-пероксидаза, а через 30 хв додавали суміш ТМВ/пероксид, що приводило до перетворення субстрату в пофарбований продукт, і інтенсивність фарбування оцінювали фотометрично за допомогою рідера для ELISA з використанням фільтра, встановленого на довжину хвилі 450 нм. Дані про вміст Aβ у зразках одержували шляхом порівняння абсорбції зі стандартної кривої, побудованої з використанням синтетичного Aβ₁₋₄₀ або Aβ₁₋₄₂. Дані виражали у вигляді індивідуальних змін відносно усередненого контрольного значення (у відсотках до контролю).

При пасивній імунізації мишей, які несуть один трансген hAPP, за допомогою двох і.p-ін'єкцій моноклональним антитілом ACI-01-Ab7 C2 у дозі 300 мкг (Aβ₁₋₄₀: -27,3±13,9 %, p<0,05; Aβ₁₋₄₂: -8,6±22,4, p=0,56; неспарений t-критерій Стьюдента) загальна кількість Aβ₁₋₄₀ у гомогенатах головного мозку знижувалася достовірно, а кількість Aβ₁₋₄₂ у цілому знижувалася, але не достовірно, у той час як при використанні доз 100 і 1000 мкг достовірних відмінностей не виявлено. Імунізації дозою 100 мкг приводила до підвищення рівня Aβ₁₋₄₀ і Aβ₁₋₄₂ у гомогенатах головного мозку (Aβ₁₋₄₀: 32,3±36,8 %; Aβ₁₋₄₂: 38,3±51,4 %), а обробка дозою 1000 мкг приводила до вираженої тенденції зниження амілоїдного завантаження й могла мати потенційну достовірну ефективність при збільшенні кількості тварин у групі (Aβ₁₋₄₀: -2,2±26,0 %; Aβ₁₋₄₂: -9,3±15,9 %). Ці дані свідчать про те, що протокол гострої імунізації антитілом mACI-01-Ab7 C2 може приводити

до зниження загальної кількості А β у головному мозку на цій мишачій моделі хвороби Альцгеймера (AD). Важливо відзначити, що, залежність від дози є короточасною, тому для одержання статистичних достовірних результатів потрібно проводити більшу кількість експериментів з використанням більших груп.

5 Приклад 16: Вплив постійного пасивного введення mACI-01-Ab7 C2 на завантаження бляшками в дослідках на мишах, які несуть подвійний трансген лінії hAPP \times PSI

Для оцінки здатності *in vivo* моноклонального антитіла mACI-01-Ab7 C2 зв'язуватися й знижувати рівень амілоїдних бляшок у головному мозку використовували 3,5 місячних мишей, які несуть подвійний трансген hAPP \times PSI¹⁰, підібраних за статтю й віком, у досліді з 4-місячної постійної пасивної імунізації. Амілоїдні бляшки аналізували наприкінці досліду шляхом гістохімічного аналізу головного мозку тварин із зв'язування тіофлавіну S.

15 15 трансгенним тваринам вводили щотижня протягом 16 тижнів по 500 мкг моноклонального антитіла в ЗФР. 15 твариною ін'єкували тільки ЗФР, і вони служили контролем. Всі ін'єкції здійснювали внутрішньочеревинно. При умертвінні мишей анестезували й пропускали через серце струмінь фізіологічної сироватки при 4 °C для видалення крові із судин головного мозку. Потім головою мозок вилучали із черепа й розділяли задній мозок і передній мозок шляхом коронального/фронтального розрізу. Передній мозок розділяли нарівно на ліву й праву півсферу за допомогою сагітального розрізу по середній лінії. Одну півсферу потім фіксували протягом ночі в 4 %-ному параформальдегіді для гістологічного аналізу. Одержували сагітальні вібраторні зрізи (40 мкм) для інкубації у вільному потоці й зберігали при 4 °C до фарбування в ЗФР 0,1 %-ним азидом натрію. По п'ять зрізів, отриманих на різних рівнях, фарбували для виявлення щільних бляшок за допомогою тіофлавіну S. Зрізи всіх тварин довільно відбирали для фарбування й кількісної оцінки наосліп. Зображення одержували за допомогою мікроскопа Leica DMR, обладнаного камерою Sony DXC-9100P, і аналізували за допомогою комп'ютера з використанням програми Leica Q-Win. Інтенсивність світла й установочні параметри конденсора для мікроскопа підтримували на постійному рівні в процесі одержання зображень. Всі отримані зображення обробляли за допомогою тих самих комп'ютерних підпрограм для мінімізації помилок, зв'язаних з людським фактором (дослідником). Гранична щільність зрізів була постійною в процесі аналізу. Для автоматичної кількісної оцінки амілоїдної завантаження при фарбуванні тіофлавіном S була обрана ділянка підставки (перехідна ділянка між парагіпокампульною звивиною й амонічним рогами).

Загальне завантаження бляшками й кількість бляшок в ділянці основи можна достовірно знижувати шляхом описаної вище пасивної імунізації мишей, які несуть подвійний трансген hAPP/PS1, протягом 4 місяців. При цьому було досягнуто достовірне зниження завантаження бляшками на 31 % (mACI-01-Ab7 C2: $1,11 \pm 0,21$ % і контроль: $1,61 \pm 0,35$ %; $p=0,003$, U-критерій Манна-Уїтні), у той же час постійна пасивна імунізація вірогідно знижувала кількість бляшок на 19 % (mACI-01-Ab7 C2: $8,73 \pm 1,36$ і контроль: $10,78 \pm 1,36$; $p=0,006$, U-критерій Манна-Уїтні), ці дані свідчать про те, що солюбілізація бляшок відбувається в дещо меншому ступені, ніж руйнування бляшок.

40 Приклад 17: Вплив пасивної вакцинації за допомогою mACI-01-Ab7 C2 на здатність до запам'ятовування в мишей, що несуть один трансген hAPP

Для аналізу *in vivo* здатності антитіла mACI-01-Ab7 C2 модифікувати або збільшувати когнітивну функцію для дослідів з пасивної імунізації використовували 9-місячних мишей, що несуть один трансген hAPP, підібраних за статтю й віком. Непросторову здатність до запам'ятовування оцінювали наприкінці періоду імунізації за допомогою нового тесту Object Recognition Task (ORT) (завдання на упізнання об'єкта).

45 Групам по 12 тварин вводили внутрішньочеревинно дві ін'єкції по 400 мкг моноклонального антитіла в 200 мкл ЗФР, контрольним тваринам вводили тільки ЗФР. Через 1 день після другої ін'єкції здатність до запам'ятовування вивчали за допомогою нового завдання на упізнання об'єкта)^{12, 13}. Відібраних для досліду мишей поміщали на 10 хв на арену для поведінкових дослідів і ставили перед ними новий незнайомий об'єкт (предмет). Реєстрували час дослідження. Через 3 год. цих же тварин знову поміщали на цю же арену для 2-ого сеансу, але перед ними ставили старий, раніше досліджений, об'єкт, а також новий об'єкт. Знову реєстрували час дослідження обох об'єктів і розраховували отриманий у результаті коефіцієнт упізнання, який визначали як відношення часу, витраченого на дослідження нового об'єкта, у порівнянні із загальним часом, витраченим на дослідження, і виражали у вигляді змін відносно контролю.

55 Пасивна вакцинація mACI-01-Ab7 C2 приводила до істотного підвищення когнітивної здатності до запам'ятовування в мишей, що несуть один трансген, моделей AD (mACI-01-Ab7 C2: $131,6 \pm 9,1$ % і контроль: $100,0 \pm 9,2$ %, $p<0,05$; неспарений t-критерій Ст'юдента й $n=12$ у

кожній групі).

Депонування

- Відповідно до Будапештського договору в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур ("Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)", Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig) депоновані наступні лінії клітин гібридом:

Позначення лінії гібридоми	Позначення антитіла	Дата депонування	Реєстраційний номер
FP 12H3	mACI-01-Ab7	01 грудня 2005 р.	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACI-01-Ab7C2	01 грудня 2005 р.	DSM ACC2750
FP 12H2-G2	mACI-01-Ab7G2	01 грудня 2005 р.	DSM ACC2751
ET 7E3	mACI-02-Ab6	08 грудня 2005 р.	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	08 грудня 2005 р.	DSM ACC2756

Джерела інформації

1. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T, Nature Med. 6, 2000, cc. 916-919.
2. Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H, "Globular amyloid beta-peptide oligomer-a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease", J Neurochem, 95, 2005, cc. 834-847.
3. Baschong W, Wrigley NG, "Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview", J Electron Microscop Tech 14, 1990, cc.313-323.
4. Blond i Goldberg, PNAS, т. 84, № 5, 1 марта 1987 г., cc. 1147-1151.
5. Cornilescu G, Delaglio F, Bax A., J.Biomol.NMR, 13, 1999, cc. 289-302.
6. Burdick. D. i др., "Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs", J. Biol. Chem. 267, 1992, cc. 546-554.
7. DeMattos, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman D.M, Proc Natl Acad Sci U S A 98, 2001, cc. 8850-8855.
8. Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF, "Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1", J Neurosci 20, 2000, cc. 6452-6458.
9. Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F, "Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice", J Neurosci 22, 2002, cc. 3445-3453.
10. Glenner i Wong, Biochem Biophys Res Comm, 129, 1984, cc. 885-890.
11. Harlow i Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 1988.
12. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF, "Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice", J Neuroinflammation 2, 2005, c. 22.
13. Hodgson i др., Bio/Technology, 9, 1991, c.421.
14. Iwade M, Asakura T, Williamson MP., J.Biomol.NMR; 13, 1999, cc. 199-211.
15. Kirschner DA, Abraham C i Selkoe.D.J., "X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 83, 1986, cc. 503-507.
16. Khaw B. A. i др. J. Nucl. Med. 23, 1982, cc. 1011-1019.
17. Kennedy J. H., i др., Clin. Chim. Acta 70, 1976, cc. 1-31.
18. Klein WL, "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets", Neurochem Int 41(5), 2002, cc.345-352.
19. Kohler i Milstein, Nature 256, 1975, cc. 495-497.
20. LeVine, H. III, Arch Biochem Biophys 404, 2002, cc. 106-115.
21. Luca i др., 2001
22. McGeer i др., 1994
23. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF, "Early phenotypic changes in transgenic mice

that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain", J Biol Chem 274, 1999, cc. 6483-6492.

24. Nelson R. i Eisenberg. D., "Recent atomic models of amyloid fibril structure", Curr. Opin. Struct. Biol., 2006.

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

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

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

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

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

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

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

32. Sambrook i др. loc. cit.

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

34. Schenk i др., 1999.

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

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

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

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

39. Wagner i др., Journal of Liposome Research, т. 12(3), 2002, cc. 259-270. 40. Ye J., Dave U. P., Grishin N. V., Goldstein J. L. i Brown M. S., Proc Natl Acad Sci U S A 97, 2000, cc. 5123-5128.

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

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

30 43.WO 2004/058258

44. WO96/1359

45. WO96/29605

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АЦ ІММУНЕ СА

<120> Специфічні у відношенні амілоїду бета (А бета) 1-42 моноклональні антитіла, які мають терапевтичні властивості

<130> L3017 PCT

<130> L3017 PCT

<150> EP 05027092.5

<151> 2005-12-12

<150> EP 06014729.5

<151> 2006-07-14

<150> EP 06020766.9

<151> 2006-10-02

<160> 22

<170> PatentIn версія 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенний пептид Aβ₁₋₁₅

<400> 1

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

1

5

10

15

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> антигенный пептид A β ₁₋₁₆

<400> 2
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> антигенный пептид A β ₁₋₁₆(Δ 14)

<400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> антигенный пептид A β ₂₂₋₃₅

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₂₉₋₄₀

<400> 5

Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> антигенный пептид A β ₁₋₁₇

<400> 6

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

1 5 10 15

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 336

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 9

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc
 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg
 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt
 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa
336

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

<400> 10
atgaagttgc ctgttaggct gtgggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat
60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc
120

tcttcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctatct acattggtac
180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct
240

gggggtcccag acagggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc
300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg
360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaaac aaacgggctg atgctgcacc aactgta
417

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

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

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

<400> 12
 atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtgt ccaatgtgag
 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc
 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca
 180

gacaagagggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca
240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac
360

tggggccaag gctccacctc cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc
408

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe
або Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe
або Ile

<220>
<221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe
 або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 13

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

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа може представляти собою His, Asn, Gln, Lys або Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)

```

<223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Хаа може представляти собою His, Asn, Gln, Lys або Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 14

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

<210> 15

```

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа може представляти собою His, Asn, Gln, Lys або Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 15

Хаа Хаа Lys Leu Хаа Phe Phe Хаа Хаа Хаа

1 5 10

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe
 або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 16

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

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа може представляти собою His, Asn, Gln, Lys або Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 17

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

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа може представляти собою His, Asn, Gln, Lys або Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Хаа може представляти собою Asn або Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Хаа може представляти собою Lys, His, Asn, Gln або Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe
або Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Хаа може представляти собою Ala, Val, Leu, Ser або Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Хаа може представляти собою Glu або Asp

<400> 19

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

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 21

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser		
85	90	95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
115	120	125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg		
145	150	155 160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
180	185	190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
195	200	205

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

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

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
245 250 255

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
260 265 270

```

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
  275                      280                      285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
  290                      295                      300

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
  305                      310                      315                      320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
                      325                      330                      335

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
  340                      345                      350

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
  355                      360                      365

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
  370                      375                      380

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
  385                      390                      395                      400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
                      405                      410                      415

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
                      420                      425                      430

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
  435                      440                      445

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Виділене антитіло, включаючи будь-яку його функціональну частину, де антитіло або його функціональна частина розпізнають і зв'язуються з епітопом β-амілоїдного ("Aβ") білка і містять ділянки, що визначають комплементарність (CDR), варіабельного домену легкого ланцюга і CDR варіабельного домену важкого ланцюга антитіла, продукованого клітинами гібридомної лінії FP 12H3-C2, депонованої 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.

10

2. Виділене антитіло або його функціональна частина, де антитіло або його функціональна частина розпізнають і зв'язують β -амілоїдний ("A β ") білок на двох різних сайтах зв'язування білка A β , де два різні сайти зв'язування переважно залучені у зв'язування з білком A β і містять Lys-Leu у положеннях 16 і 17 і Phe-Phe у положеннях 19 і 20 наступних корових ділянок білка A β :

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

i

- а) при одночасному інкубуванні з мономерними A β -пептидами 1-42 при молярному співвідношенні 1:100, антитіло:пептиди, інкубує агрегацію A β -мономерів у високомолекулярні полімерні фібрили або філаменти і, крім того,
- б) при одночасному інкубуванні з утвореними високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, отриманими при агрегації мономерних A β -пептидів 1-42 при молярному співвідношенні 1:100, антитіло:утворені амілоїдні фібрили або філаменти здатні руйнувати агрегати, отриманих полімерних фібрил або філаментів; і
- с) при одночасному інкубуванні з утвореними високомолекулярними полімерними амілоїдними фібрилами або філаментами, отриманими при агрегації мономерних A β -пептидів 1-42, здатні викликати перехід β -складчастої конформації в α -спіраль і/або довільну спіраль молекули A β ₁₋₄₂.
3. Антитіло або його функціональна частина за п. 2, де антитіло або його функціональна частина розпізнають і зв'язуються з епітопом β -амілоїдного ("A β ") білка й містять області, що визначають комплементарність (CDR), варіабельного домену легкого ланцюга й CDR варіабельного домену важкого ланцюга антитіла, продукованого клітинами гібридомної лінії FP 12H3-C2, депонованої 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.
4. Виділене антитіло або його функціональна частина, де антитіло або його функціональна частина розпізнають і зв'язуються з природною конформацією A β -білка і містять ділянки, що визначають комплементарність варіабельного домену легкого ланцюга (LCVR) з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:7 і варіабельного домену важкого ланцюга (HCVR) з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:8.
5. Антитіло або його функціональна частина за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його функціональна частина зв'язуються з мономером A β з афінністю зв'язування, яка дорівнює від щонайменше близько 1×10^{-6} М до щонайменше 1×10^{-9} М, але не мають значної перехресної реактивності з амілоїдним білком-попередником (APP).
6. Антитіло або його функціональна частина за будь-яким з пп. 1, 2 або 4, яке є моноклональним.
7. Антитіло або його функціональна частина за будь-яким з пп. 1, 2 або 4, де антитіло або його функціональна частина є антитілом людини або гуманізованим антитілом, або химерним антитілом.
8. Антитіло або його функціональна частина за будь-яким з пп. 1-7, де антитіло здатне виявляти волокна A β ₁₋₄₂ у такій низькій кількості, як 0,01 мкг.
9. Виділене антитіло або його функціональна частина, де антитіло або його функціональна частина містять як варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) з послідовністю SEQ ID NO:8, так і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) з послідовністю SEQ ID NO:7.
10. Антитіло або його функціональна частина за п. 2, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), де варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) має амінокислотну послідовність, яка на 97 % ідентична послідовності SEQ ID NO:7, і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) має амінокислотну послідовність, яка на 90 % ідентична послідовності SEQ ID NO:8.
11. Антитіло або його функціональна частина за п. 10, де LCVR має амінокислотну послідовність, яка на 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO:7, і HCVR має амінокислотну послідовність, яка на 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO:8.
12. Виділене моноклональне антитіло або його функціональна частина, які розпізнають і зв'язують природну конформацію A β -білка, де вказане антитіло або його функціональна частина містять варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) з послідовністю SEQ ID NO:7 і 8, відповідно.
13. Виділене антитіло або його функціональна частина, продуковані гібридомною клітинною лінією, вибраною з групи, яка складається з гібридомної клітинної лінії FP 12H3, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2752 і продукуючої антитіло mACI-01-Ab7; гібридомною клітинною

лінії FP 12H3-C2, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2750 і продукууючої антитіло mACI-01-Ab7C2; гібридомної клітинної лінії FP 12H3-G2, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2751 і продукууючої антитіло mACI-01-Ab7G2; гібридомної клітинної лінії ET 7E3, депонованої 08 грудня 2005 року як DSM ACC2755 і продукууючої антитіло mACI-02-Ab6; і
 5 гібридомної клітинної лінії EJ 7H3, депонованої 08 грудня 2005 року як DSM ACC2756 і продукууючої mACI-24-Ab4.

14. Антитіло за п. 13, де гібридомна клітинна лінія являє собою FP 12H3.

15. Антитіло за п. 13, де гібридомна клітинна лінія являє собою FP 12H3-C2.

16. Антитіло за п. 13, де гібридомна клітинна лінія являє собою FP 12H3-G2.

10 17. Антитіло за п. 13, де гібридомна клітинна лінія являє собою ET 7E3.

18. Антитіло за п. 13, де гібридомна клітинна лінія являє собою EJ 7H3.

19. Антитіло за будь-яким з пп. 1-18 або його функціональні частини, де антитіло індуковане проти надмолекулярної антигенної конструкції, яка містить антигенний пептид, який відповідає амінокислотній послідовності β -амілоїдного пептиду, зокрема β -амілоїдного пептиду $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ і $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, модифікованого гідрофільними молекулами, такими як, наприклад,

15 поліетиленгліколь (PEG), або комбінацією гідрофільних молекул і гідрофобних молекул, такою як, наприклад, комбінація поліетиленгліколю (PEG) і пальмітинової кислоти, або β -амілоїдного пептиду, $A\beta_{1-15}$, модифікованого гідрофільною молекулою, такою як пальмітинова кислота, де вказана гідрофобна і гідрофільна молекула, відповідно, ковалентно зв'язані з кожним кінцем
 20 через амінокислоту, таку як, наприклад, лізин, або через будь-яку іншу прийнятну амінокислоту або амінокислотний аналог, здатний служити лінкерною молекулою.

20. Антитіло за будь-яким з пп. 1-19 або його функціональні частини, що містять епітоп-зв'язуючі фрагменти варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR) з послідовністю SEQ ID NO:7 і/або варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR) з послідовністю SEQ ID NO:8.

25 21. Виділене антитіло або його функціональна частина, які містять варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), що містить амінокислотну послідовність, яка на 97 % ідентична послідовності LCVR антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2, і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), яка містить амінокислотну послідовність, що на 90 % ідентична послідовності HCVR антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2,
 30 депонованою 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.

22. Антитіло за п. 21, де LCVR має амінокислотну послідовність, яка на 98 % або 99 % ідентична послідовності LCVR антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2, і HCVR має амінокислотну послідовність, яка на 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і 99 % ідентична послідовності HCVR антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2, депонованою 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.

35 23. Виділене моноклональне антитіло або його функціональна частина, які розпізнають і зв'язують природну конформацію білка $A\beta$, де вказане антитіло або його функціональна частина містять варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR) і варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) з послідовностями LCVR і HCVR, відповідно, антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2, депонованою 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.

40 24. Виділене антитіло або його функціональна частина, що містять епітоп-зв'язуючі фрагменти варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR) і варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR) антитіла, продукованого гібридомною клітинною лінією FP 12H3-C2, депонованою 1 грудня 2005 року як DSM ACC2750.

45 25. Полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 4, 9, 10 або 19.

26. Полінуклеотид за п. 25, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло або його функціональні частини, що містить:

а) нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга SEQ ID NO: 9;

50 б) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності (а) у послідовності кодону через виродженість генетичного коду;

с) нуклеотидну послідовність із послідовністю, комплементарною (а) і (б);

д) нуклеотидну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:10;

55 е) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності (д) у послідовності кодону через виродженість генетичного коду;

ф) нуклеотидну послідовність з послідовністю, яка комплементарна (д) і (е);

г) нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 11;

60 х) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності (г) в послідовності кодону через виродженість генетичного коду;

і) нуклеотидну послідовність із послідовністю, яка комплементарна (г) і (х);

j) нуклеотидну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 12;
 к) нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від нуклеотидної послідовності (j) в послідовності кодону через виродженість генетичного коду; або
 l) нуклеотидну послідовність із послідовністю, яка комплементарна (j) і (к).

- 5 27. Композиція, яка містить антитіло або його функціональну частину, за будь-яким з пп. 1-24.
28. Композиція за п. 27, де антитіло знаходиться в терапевтично ефективній кількості.
29. Композиція за п. 27 або 28, яка є композицією, що необов'язково додатково містить фармацевтично прийнятний носій.
- 10 30. Композиція за будь-яким з пп. 27-29 для застосування для лікування або діагностики захворювання або розладу, які викликані або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, таким як білок А β , що бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера.
31. Суміш, яка містить антитіло або його функціональну частину за будь-яким з пп. 1-24 у терапевтично ефективній кількості і, необов'язково, додаткову біологічно активну речовину і/або фармацевтично прийнятний носій, і/або розчинник, і/або ексципієнт.
- 15 32. Суміш за п. 31, де додаткова біологічно активна речовина являє собою сполуку, яка використовується для одержання композиції для лікування захворювань і порушень, що викликані або асоційовані з амілоїдом або амілоїдоподібними білками, включаючи амілоїдоз, групу захворювань і порушень, асоційованих з амілоїдом або амілоїдоподібним білком, таким як
- 20 білок А β , який бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера.
33. Суміш за п. 31 або 32, яка містить на додаток до антитіла або його функціональної частини за будь-яким з пп. 1-24 щонайменше одну сполуку, вибрану з групи, що складається з ніацину, мемантину, хелатів металів, пірензепіну і метаболітів, 3-аміно-1-пропансульфонової кислоти (3APS), 1,3-пропандисульфону (1,3PDS), білків tau, нейтротрансмітерів, інгібіторів
- 25 холінергестери (ChEI), таких як такрин, ривастигмін, донепезил і/або галантамін, і інших лікарських засобів і харчових добавок, у комбінації з антитілом за будь-яким з пп. 1-24 і, необов'язково, фармацевтично прийнятним носієм і/або розріджувачем, і/або ексципієнтом.
34. Спосіб одержання антитіла або його функціональної частини за будь-яким з пп. 1-24, який включає продукування в прийнятному організмі-хазяїні антитіл проти надмолекулярної
- 30 антигенної конструкції, що містить антигенний пептид, який відповідає амінокислотній послідовності β -амілоїдного пептиду, зокрема β -амілоїдного пептиду А β_{1-15} , А β_{1-16} і А $\beta_{1-16}(\Delta 14)$, модифікований гідрофільною молекулою, такою як, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ), або комбінацією гідрофільної і гідрофобної молекули, такою як, наприклад, комбінація поліетиленгліколю (ПЕГ) і пальмітинової кислоти, або β -амілоїдний пептид А β_{1-15} ,
- 35 модифікований гідрофільною молекулою, такою як пальмітинова кислота, де вказана гідрофобна і гідрофільна молекула, відповідно, зв'язана ковалентним зв'язком на кожному кінці через амінокислоту, таку як, наприклад, лізин, або будь-яку іншу прийнятну амінокислоту або аналог амінокислоти, які можуть служити як лінкерні молекули; і виділення антитіла.
35. Застосування антитіла і/або його функціональної частини за будь-яким з пп. 1-24 і/або
- 40 фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 27-30, або суміші за будь-яким з пп. 31-33 для одержання лікарського засобу для лікування або полегшення протікання амілоїдозу, групи захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і пов'язаний з віком амілоїдоз, включаючи, але ними не обмежуючись, неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), і захворювання або порушення, які
- 45 характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, пов'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які зумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз;
- 50 хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, пов'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний бічний склероз), міозит, який викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини і інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.
36. Спосіб одержання фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 27-30, або суміші за будь-яким з пп. 31-33, використовуючи антитіло або його функціональну частину або їх комбінації, за
- 55 будь-яким з пп. 1-24, для застосування для лікування або полегшення протікання амілоїдозу, групи захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і пов'язаний з віком амілоїдоз, включаючи, але ними не обмежуючись, неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), і захворювання або порушення,
- 60 що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як

помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, пов'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, пов'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний бічний склероз), міозит, що викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини і інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

37. Спосіб одержання фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 27-30, використовуючи антитіло або його функціональну частину за будь-яким з пп. 1-24, що включає формування вказаного антитіла у фармацевтично прийнятній формі.

38. Спосіб за п. 37, де антитіло входить до складу композиції в терапевтично ефективній кількості.

39. Композиція за будь-яким з пп. 27-30 для застосування для зниження рівня бляшок у мозку тварини, що страждає на захворювання і порушення, як визначено в п. 36.

40. Композиція за будь-яким з пп. 27-30 для застосування для зниження кількості бляшок у мозку тварини, що страждає на захворювання і порушення, як визначено в п. 36.

41. Композиція за будь-яким з пп. 27-30 для застосування для зниження загальної кількості розчинного А β у мозку тварини, що страждає на захворювання і порушення, як визначено в п. 36.

42. Композиція за будь-яким з пп. 39-41, де тварина є ссавцем.

43. Композиція за п. 42, де ссавець є людиною.

44. Композиція за будь-яким з пп. 27-30 для застосування для лікування або полегшення протікання амілоїдозу, групи захворювань і порушень, асоційованих з утворенням амілоїдних бляшок, включаючи вторинний амілоїдоз і пов'язаний з віком амілоїдоз, включаючи, але ними не обмежуючись, неврологічні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера (AD), і захворювання або порушення, що характеризуються втратою когнітивної здатності до запам'ятовування, такі, наприклад, як помірне погіршення когнітивної здатності (MCI), деменція, пов'язана з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий церебральний крововилив, що супроводжується амілоїдозом (типу Дутча); комплекс деменції Гуама-Паркінсона, а також інші захворювання, які обумовлені або асоційовані з амілоїдоподібними білками, такі як прогресуючий над'ядерний параліч, розсіяний склероз; хвороба Крейцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, пов'язана з ВІЛ деменція, ALS (аміотрофічний бічний склероз), міозит, що викликається тільцями включення (IBM), діабет дорослих; старечий серцевий амілоїдоз; ендокринні пухлини і інші захворювання, включаючи дегенерацію жовтої плями.

45. Композиція за будь-яким з пп. 27-30 для застосування для збереження або підвищення когнітивної здатності до запам'ятовування у ссавця, який має асоційоване з амілоїдом захворювання або стан, як визначено в п. 36.

46. Гібридомна клітинна лінія для застосування для продукування антитіл, яка відрізняється тим, що продукує антитіло за будь-яким з пп. 1-24.

47. Гібридомна клітинна лінія, вибрана з групи, що складається з гібридомної клітинної лінії FP 12H3, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2752 і продукуючої антитіло mACI-01-Ab7; гібридомної клітинної лінії FP 12H3-C2, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2750 і продукуючої антитіло mACI-01-Ab7C2; гібридомної клітинної лінії FT 12H3-G2, депонованої 01 грудня 2005 року як DSM ACC2751 і продукуючої антитіло mACI-02-Ab6; гібридомної клітинної лінії FT 7E3, депонованої 08 грудня 2005 року як DSM ACC2755; і гібридомної клітинної лінії EJ 7E3, депонованої 08 грудня 2005 року як DSM ACC2756 і продукуючої антитіло mACI-24-Ab4.

48. Спосіб діагностики асоційованого з амілоїдом захворювання або порушення у пацієнта, що включає виявлення імуноспецифічного зв'язування антитіла або його активного фрагмента з епітопом амілоїдного білка у зразку, що включає стадії, у яких:

(а) приводять у контакт зразок, який передбачувано містить амілоїдний антиген, з антитілом за будь-яким з пп. 1-24, де антитіло зв'язується з епітопом амілоїдного білка;

(b) дозволяють антитілу зв'язатися з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу;

(c) визначають формування імунологічного комплексу; і

(d) визначають кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу і присутністю або відсутністю амілоїдного антигену у зразку.

49. Спосіб визначення ступеня ураження тканини амілоїдогенними бляшками, який включає:

(а) одержання зразка, характерного для досліджуваної тканини;

- (b) оцінку наявності у зразку амілоїдного антигену за допомогою антитіла за будь-яким з пп. 1-24;
- (c) визначення кількості антитіла, зв'язаного з амілоїдним антигеном; і
- (d) розрахунок ураження бляшками тканини.
- 5 50. Спосіб за п. 48, в якому визначають формування імунологічного комплексу на стадії с), так що присутність або відсутність імунологічного комплексу корелює з присутністю або відсутністю амілоїдного антигену.
51. Спосіб діагностики схильності до асоційованого з амілоїдом захворювання або стану у пацієнта, що включає виявлення імуноспецифічного зв'язування антитіла або його активного фрагмента з епітопом амілоїдного білка у зразку, для чого:
- 10 (a) приводять у контакт зразок з антитілом за будь-яким з пп. 1-24, де антитіло зв'язується з епітопом амілоїдного білка;
- (b) дозволяють антитілу зв'язатись з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу;
- 15 (c) виявляють формування імунологічного комплексу;
- (d) визначають кореляцію між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу з присутністю або відсутністю амілоїдного антигену у зразку; і
- (e) порівнюють кількість імунологічного комплексу з кількістю в нормальному контрольному зразку,
- 20 при цьому підвищення кількості вказаного імунологічного комплексу в порівнянні з кількістю в нормальному контрольному зразку свідчить про те, що пацієнт страждає або має ризик розвитку асоційованого з амілоїдом захворювання або порушення.
52. Спосіб моніторингу мінімальних залишкових ознак захворювання у пацієнта після лікування антитілом або композицією за будь-яким з попередніх пунктів, де вказаний спосіб включає:
- 25 (a) приведення у контакт зразка пацієнта, в якому передбачувано міститься антиген амілоїду, з антитілом за будь-яким з пп. 1-24, де антитіло зв'язується з епітопом амілоїдного білка;
- (b) зв'язування антитіла з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу;
- (c) виявлення формування імунологічного комплексу;
- (d) визначення кореляції між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу із
- 30 присутністю або відсутністю амілоїдного антигену у зразку; і
- (e) порівняння кількості вказаного імунологічного комплексу з кількістю в нормальному контрольному зразку,
- при цьому підвищення кількості вказаного імунологічного комплексу в порівнянні з кількістю в нормальному контрольному зразку свідчить про те, що пацієнт все ще страждає мінімальними залишковими ознаками захворювання.
- 35 53. Спосіб прогнозування чутливості пацієнта, який одержує лікування антитілом або його активним фрагментом, композицією за будь-яким з попередніх пунктів, що включає:
- (a) приведення у контакт зразка пацієнта, в якому передбачувано міститься антиген амілоїду, з антитілом за будь-яким з пп. 1-24, де антитіло зв'язується з епітопом амілоїдного білка;
- 40 (b) зв'язування антитіла з амілоїдним антигеном з утворенням імунологічного комплексу;
- (c) виявлення формування імунологічного комплексу;
- (d) визначення кореляції між присутністю або відсутністю імунологічного комплексу із присутністю або відсутністю амілоїдного антигену у зразку, і
- (e) порівняння кількості імунологічного комплексу до і після початку лікування,
- 45 при цьому зниження кількості вказаного імунологічного комплексу свідчить про те, що пацієнт має високу імовірність того, що він буде відповідати на лікування.
54. Тест-набір для виявлення і діагностики асоційованих з амілоїдами захворювань і порушень, який містить антитіла за будь-яким з пп. 1-24.
55. Клітинна лінія, яка продукує антитіло за будь-яким одним з пп. 1-24.
- 50 56. Клітинна лінія, яка містить полінуклеотид за будь-яким одним з пп. 25 або 26.
57. Клітинна лінія за будь-яким з пп. 55 або 56, де клітинна лінія є клітинною лінією ссавця, бактерії або комахи.
58. Спосіб одержання антитіла або його функціонального фрагмента, що включає стадію культивування клітинної лінії за будь-яким з пп. 46, 47, 55 або 56.
- 55 59. Спосіб одержання антитіла або його функціонального фрагмента, що включає експресування в клітині полінуклеотиду за будь-яким з пп. 25 або 26.

A β ₁₋₁₅ (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys-Lys-OH

A β ₁₋₁₆ (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β _{1-16(Δ 14)} (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

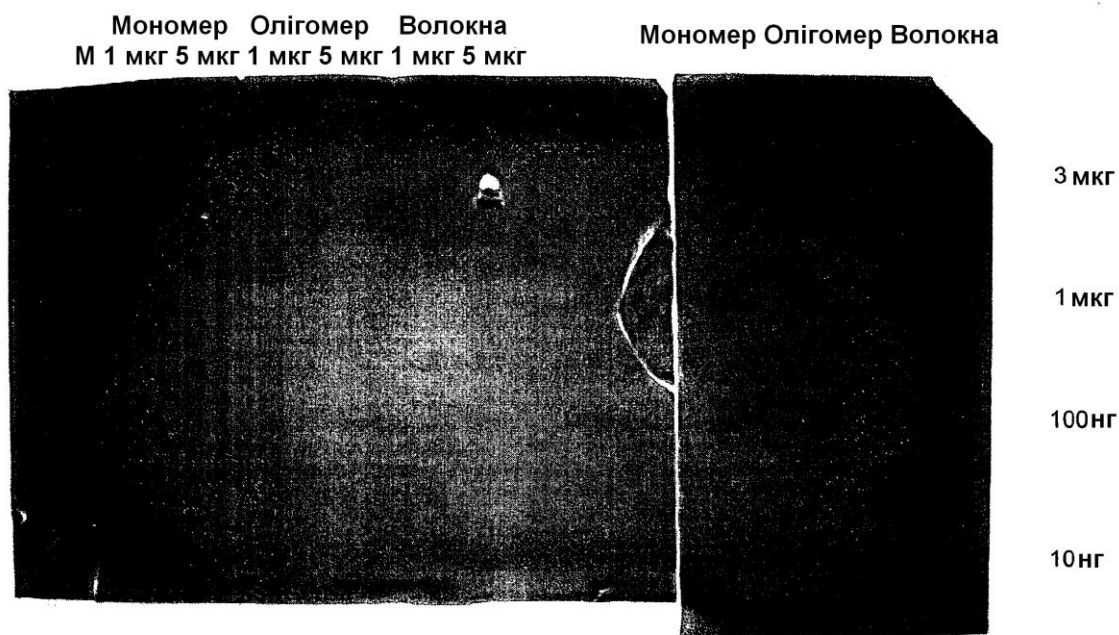
A β ₂₂₋₃₅ (ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

A β ₂₉₋₄₀ (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

Фиг. 1



Фиг. 2а

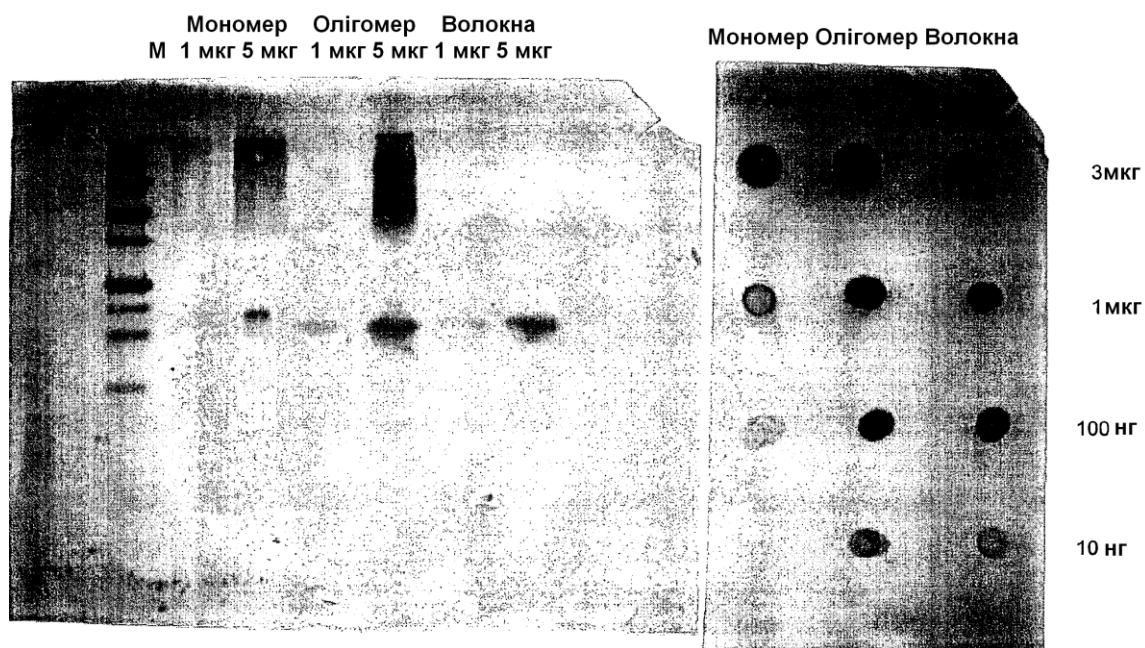


Fig. 26

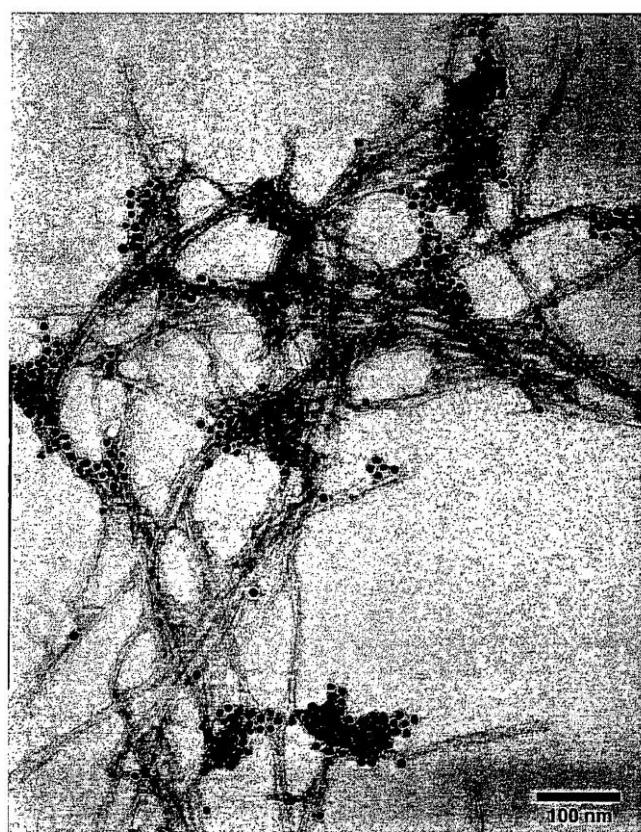


Fig. 3a

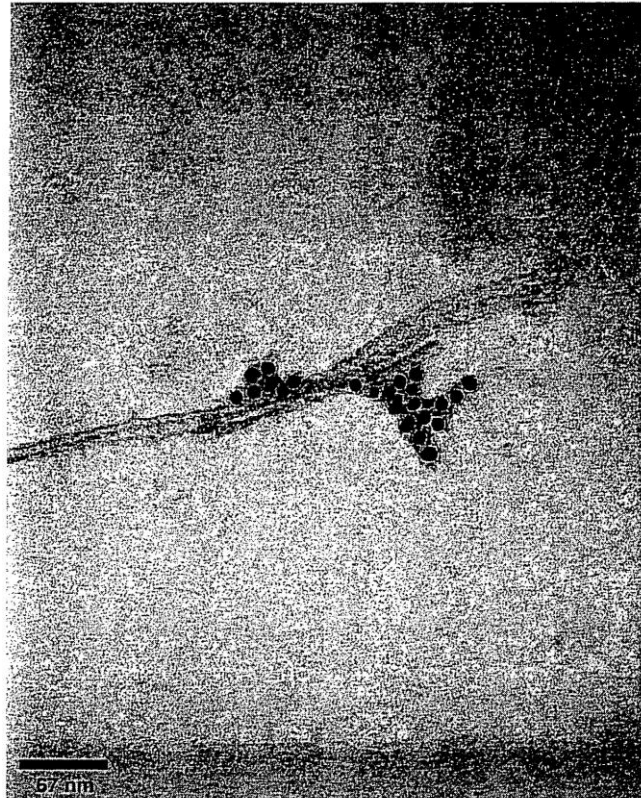
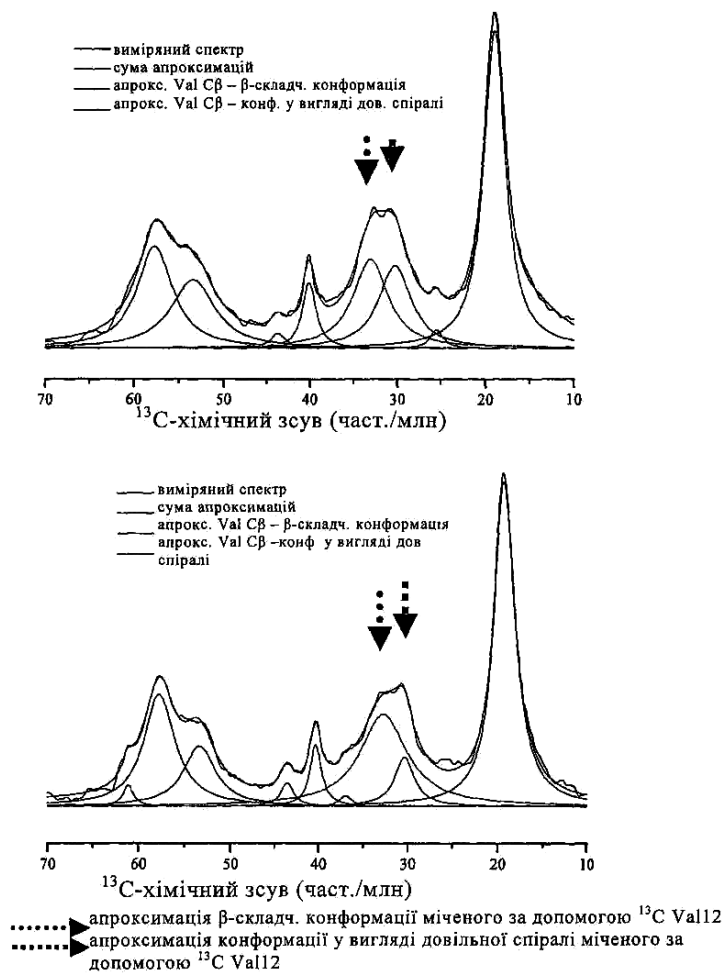


Fig. 36



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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