



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010100342/10, 12.06.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.06.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.06.2007 US 60/943,509

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2011 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 10.11.2015 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007/064972 A2, 07.06.2007US 2005/037000 A1, 17.02.2005US 2005/009150 A1, 13.01.2005WO 03/016466 A2, 27.02.2003BARD F. et al., "Epitope and isotype specificities of antibodies to [beta]-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology", PNAS, 2003, 100(4): 2023-2028WO 2006/103116 A1, 05.10.2006US 6,750,324 B1, (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 12.01.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2008/007318 (12.06.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/156622 (24.12.2008)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

Андреа ПФАЙФЕР (CH),
Мария ПИЛЬГРЕН (CH),
Андреас МУС (CH),
Райан УОТТС (US)

(73) Патентообладатель(и):

АЦ ИММУНЕ С.А. (CH),
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К АМИЛОИДУ БЕТА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Предложено гуманизированное антитело и его фрагмент, способные специфически связывать бета-амилоид, охарактеризованные фрагментами последовательностей на основе антитела мыши 8F5, и Fc-областью человеческого IgG1, содержащей аминокислотную замену D265A; а также кодирующая нуклеиновая

кислота, вектор экспрессии, продуцирующие антитело или его фрагмент клетки, способ продуцирования антитела или его фрагмента; композиция, применение антитела и его фрагмента для изготовления лекарственного средства, способ предупреждения, лечения или облегчения эффектов амилоидоза; способ диагностики амилоид-ассоциированных

заболеваний или состояний, способ определения степени нагрузки амилоидогенных бляшек и тест-набор для выявления и диагностики амилоид-ассоциированных бляшек. Предложенное антитело обладает способностью специфически

связываться с мономерами бета-амилоида и высокомолекулярными полимерами бета-амилоида, что может найти применение в терапии амилоидозов. 12 н. и 17 з.п. ф-лы, 20 ил., 6 табл., 16 пр.

(56) (продолжение):

15.06.2004WO 2006/066171 A1, 22.06.2006WO 02/46237 A2, 13.06.2002RU 2004/128259 A, 10.08.2005WO 2006/019447 A1, 23.02.2006

R U 2 5 6 7 1 5 1 C 2

R U 2 5 6 7 1 5 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 567 151** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010100342/10, 12.06.2008

(24) Effective date for property rights:
12.06.2008

Priority:

(30) Convention priority:
12.06.2007 US 60/943,509

(43) Application published: 20.07.2011 Bull. № 20

(45) Date of publication: 10.11.2015 Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: 12.01.2010

(86) PCT application:
US 2008/007318 (12.06.2008)

(87) PCT publication:
WO 2008/156622 (24.12.2008)

Mail address:

105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"

(72) Inventor(s):

Andrea PFAJFER (CH),
Marija PIL'GREN (CH),
Andreas MUS (CH),
Rajan UOTTS (US)

(73) Proprietor(s):

ATs IMMUNE S.A. (CH),
DZhENENTEK, INK. (US)

(54) HUMANISED ANTIBODIES TO AMYLOID BETA

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: claimed invention relates to field of biotechnology. Claimed is humanised antibody and its fragment, able to specifically bind beta-amyloid, characterised by fragments of sequences based on mouse antibody 8F5, and Fc-region of human IgG1, containing amino acid D265A substitution, as well as coding nucleic acid, expression vector, producing antibody or its cell fragment, method of producing antibody or its fragment; composition, application of antibody and its fragment for medication manufacturing,

method of prevention, treatment or alleviation of amyloidosis effects; method of diagnosing amyloid-associated diseases or states, method of determining degree of amyloidogenic plaques and test-set for detection and diagnostics of amyloid-associated plaques.

EFFECT: claimed antibody possesses ability of specific binding with beta-amyloid monomers and highly molecular beta-amyloid polymers, which can be applied in therapy of amyloidoses.

29 cl, 20 dwg, 6 tbl, 16 ex

Перекрестные сведения на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основе предварительной заявки на патент США US 60/943509, поданной 12 июня 2007 г., которая включена в настоящее изобретение в виде ссылки.

5 Предпосылки создания изобретения

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для диагностики и лечения амилоидозов - группы заболеваний и расстройств, связанных с амилоидным белком, например болезни Альцгеймера.

Амилоидоз означает не единственное заболевание, а разнородную группу
10 прогрессирующих процессов, отличающихся внеклеточными тканевыми отложениями восковидного крахмалоподобного белка, называемого амилоидом, который накапливается в одном или нескольких органах или системах организма. По мере накопления отложений амилоида, они начинают мешать нормальному функционированию органа или системы организма. Имеется по меньшей мере 15 разных
15 типов амилоидоза. Основными формами являются первичный амилоидоз без известных предшествующих проявлений заболевания, вторичный амилоидоз, проявляющийся после некоторого другого болезненного состояния, и наследственный амилоидоз.

Вторичный амилоидоз формируется во время хронической инфекции или воспалительного заболевания, например, туберкулеза, бактериальной инфекции,
20 называемой семейной средиземноморской лихорадкой, костных инфекций (остеомиелитов), ревматоидного артрита, воспаления тонкой кишки (грануломатозного илеита), болезни Ходжкина и лепры.

К амилоидным отложениям относятся пентагональный компонент Р амилоида (amyloid pentagonal - AP), гликопротеин, близкий к нормальному сывороточному
25 амилоиду Р (serum amyloid Р - SAP), и сульфатированные глюкозаминогликаны (glycosaminoglycans - GAG), сложные углеводы соединительной ткани. Амилоидные белковые фибриллы, которые составляют примерно до 90% амилоидного материала, представляют один из нескольких различных типов белков. Эти белки способны складываться в так называемые «бета-складчатые» плоские фибриллы - уникальную
30 белковую конфигурацию, которая имеет сайты связывания для красителя Конго красного, и в результате возникает уникальное для амилоидного белка свойство - окрашивание.

Многие возрастные заболевания основаны или связаны с белками амилоидного типа и В частности, характеризуются накоплением внеклеточных отложений амилоида или
35 амилоидо-подобного материала, который участвует в патогенезе, а также в прогрессировании заболевания. К таким заболеваниям относятся, но ими не ограничиваются, неврологические заболевания, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-
40 деменция о.Гуам. К другим заболеваниям, которые связаны с белками амилоидного типа, относятся прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая
45 дегенерацию желтого пятна.

Хотя патогенез этих заболеваний может быть различным, свойственные им отложения часто содержат много общих молекулярных составляющих. В значительной степени это может быть связано с локальной активацией провоспалительных метаболических

путей, ведущих к сопутствующему отложению активированных компонентов комплемента, тем самым, приводя к сопутствующему отложению активированных компонентов комплемента, компонентов острой фазы, иммунных модуляторов и других медиаторов воспаления (McGeer и др., 1994).

5 Болезнь Альцгеймера (БА) является нейрологическим расстройством, предположительно вызываемым амилоидными бляшками, накоплением нарушенного отложения белков в мозге. Наиболее часто тип амилоида, обнаруженного в мозге больных, преимущественно состоит из фибрилл Аβ. Научное подтверждение заключается в том, что повышение выработки и накопления бета-амилоидного белка в бляшках
10 приводит к отмиранию нервных клеток, которое влияет на развитие и прогрессирование БА. Утрата нервных клеток в стратегически важных участках мозга в свою очередь вызывает снижение содержания нейротрансмитеров и ухудшает память. К белкам, играющим основную роль в формировании бляшек, относятся амилоидный белок-предшественник (amyloid precursor protein - APP) и два презенилина (презенилин I и
15 презенилин II). Последующее расщепление амилоидного белка-предшественника (APP), который экспрессируется конститутивно и подвергается катаболизму в большинстве клеток, ферментами β и γ секретазы приводит к высвобождению пептида Аβ, включающего от 39 до 43 аминокислот. Разрушение белков APP вероятно повышает их предрасположенность агрегировать в бляшки. Особенно это относится к фрагменту
20 Аβ(1-42), который имеет высокую предрасположенность к связыванию агрегатов из-за двух в высокой степени гидрофобных аминокислотных остатков по С-концу. Поэтому предполагают, что фрагмент Аβ(1-42) преимущественно вовлечен и ответственен за инициацию формирования старческих бляшек у больных БА, и соответственно обладает высоким патологическим потенциалом. Таким образом, существует потребность в
25 агентах для предупреждения формирования амилоидных бляшек и растворения имеющихся бляшек у больных БА.

Симптомы болезни Альцгеймера проявляются медленно, и первым симптомом может быть небольшая забывчивость. На этой стадии индивидуумы могут забывать недавние события, поступки, имена знакомых людей или названия предметов и могут быть не в
30 состоянии решить простые математические задачи. По мере прогрессирования заболевания симптомы становятся более заметными и достаточно серьезными, чтобы больные БА или их родственники стали обращаться за медицинской помощью. На средней стадии БА к симптомам относятся утрата способности выполнять простые задачи, например, поддержание личной гигиены, и проблемы, связанные с речью,
35 пониманием, чтением или письмом. Пациенты на последующей стадии БА могут пребывать в состоянии обеспокоенности или агрессии, могут уйти из дома, а также могут полностью нуждаться в уходе.

В настоящее время единственным точным способом диагностики БА является идентификация бляшек и сплетений в ткани мозга при аутопсии после смерти
40 индивидуума. Следовательно, врачи могут диагностировать БА только «приблизительно» или «примерно» при жизни пациента. С помощью современных методов врачи могут с точностью диагностировать БА до 90% случаев, используя некоторые средства для диагностики «возможной» БА. Врачи проводят опрос об общем состоянии здоровья пациента, перенесенных заболеваниях, а также о появлении каких-
45 либо осложнений в быту. Поведенческое тестирование памяти, решения задач, внимания, счета и речи дают информацию о когнитивном вырождении, а медицинские анализы, например, крови, мочи, спинномозговой жидкости и сканирование мозга, могут предоставить некоторую дополнительную информацию.

Поддержание состояния пациентов с БА заключается в медицинском и немедицинском уходе. Способы лечения, направленные на изменение течения болезни (откладывая или ревертируя ее прогрессирование) до настоящего времени почти совсем неэффективны. Было показано, что лекарственные средства, которые восстанавливают недостаточность (дефицит) или нарушенное действие химических посредников нервных клеток (нейротрансмиттеров), В частности, ингибиторов холинэстеразы (cholinesterase inhibitor - ChEI), например, такрин и ривастигмин, проявляют улучшение симптомов. Ингибиторы ChEI препятствуют ферментативному разрушению нейротрансмиттеров, тем самым, повышая содержание химических посредников, способных передавать нервный сигнал в мозг.

У некоторых людей на ранних и средних стадиях заболевания лекарственные средства такрин (продукт COGNEX®, Morris Plains, NJ), донепезил (продукт ARICEPT®, Токия, Япония), ривастигмин (продукт EXELON®, Восточный Гоновер, Нью-Джерси) или галантамин (продукт REMINYL®, Нью-Брунсуик, Нью-Джерси) могут помочь предупредить наихудшее проявление некоторых симптомов в течение ограниченного периода времени. Другое лекарственное средство, мемантин (продукт NAMENDA®, Нью-Йорк, Нью-Йорк), было одобрено для лечения БА, проявляющейся в формах от умеренных до тяжелых. Медикаментозные средства также применимы для лечения психиатрических проявлений БА. Кроме того, некоторые медикаментозные средства могут способствовать контролю поведенческих симптомов при БА, например, бессонницы, беспокойства, блуждания, состояния тревоги и депрессии. Лечение этих симптомов часто облегчает существование больных, делая его более комфортабельным, и облегчает уход за ними для персонала. К сожалению, несмотря на существенные преимущества лечения, показавшего, что агенты этого класса стабильно лучше плацебо, болезнь продолжает прогрессировать и обычное воздействие на ментальное функционирование проявляется умеренно. Многие лекарственные средства, используемые для лечения БА, например, ChEI, также обладают побочными эффектами, к которым относятся желудочно-кишечные расстройства, печеночная токсичность и потеря массы тела.

Другим заболеванием, связанным или основанным на накоплении и отложении белка типа амилоида, является дегенерация желтого пятна.

Дегенерация желтого пятна представляет распространенное заболевание, при котором происходит повреждение желтого пятна, являющегося центральной областью сетчатки (ткани, толщиной с лист бумаги в задней части глаза, из которой светочувствительные клетки посылают зрительные сигналы в мозг). Острое, четкое, «прямое» зрение перерабатывается желтым пятном. Повреждение желтого пятна приводит к развитию слепых пятен и расплывчатому или искаженному восприятию. Возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП) представляет основную причину ухудшения зрения в США, а для людей старше 65 лет она представляет основную причину развития практической (гражданской) слепоты среди представителей европеоидной расы. Примерно 1,8 миллионов американцев в возрасте 40 лет и старше, имеющие продвинутую форму ВДЖП, и другие 7,3 миллионов американцев, имеющие промежуточную форму ВДЖП, подвержены значительному риску потери зрения. По оценке правительства к 2020 году у 2,9 миллионов людей будет продвинутая форма ВДЖП. Жертвы ВДЖП часто удивляются и расстраиваются, узнав, что о причинах слепоты и ее лечении известно слишком мало.

Имеется две формы дегенерации желтого пятна: сухая дегенерация желтого пятна и влажная дегенерация желтого пятна. Сухая форма, при которой клетки желтого пятна

начинают медленно разрушаться, диагностируют в 85% случаев дегенерации желтого пятна. Оба глаза обычно поражены сухой формой ВДЖП, хотя один глаз может потерять зрение при сохранности второго глаза. Старческие бляшки, которые представляют желтые отложения под сетчаткой, обычно представляют ранние симптомы сухой формы ВДЖП. Риск развития продвинутой сухой формы ВДЖП или влажной формы ВДЖП повышается по мере увеличения числа или размера старческих бляшек. Сухая форма ВДЖП может прогрессировать и вызвать потерю зрения без перехода к влажной форме заболевания, однако также возможен для ранней стадии сухой формы ВДЖП внезапный переход во влажную форму.

Влажная форма, хотя она встречается только в 15% случаев, в 90% приводит к слепоте, и рассматривается в виде продвинутой формы ВДЖП (нет ранней или промежуточной стадии у влажной формы ВДЖП). Влажной форме ВДЖП всегда предшествует сухая форма заболевания. По мере ухудшения сухой формы у некоторых людей начинается патологический рост кровеносных сосудов за желтым пятном. Эти сосуды очень хрупкие, и могут быть кровотечения (отсюда «влажная» дегенерация желтого пятна), вызывающие быстрое разрушение желтого пятна.

Сухая форма ВДЖП может в начальной стадии часто вызывать слегка расплывчатое зрение. Центр изображения в частности, затем может стать расплывчатым, и эта область разрастается по мере прогрессирования заболевания. Симптомы могут остаться незамеченными, если поражен только один глаз. При влажной форме ВДЖП прямые линии могут казаться волнистыми, а утрата центрального зрения может происходить быстро.

Диагностика дегенерации желтого пятна обычно включает расширенный анализ глаз, используя метод, называемый фундоскопией, который способствует диагностике ВДЖП, и, если предполагается влажная форма ВДЖП, также могут проводить флуоресцентную ангиографию. Если сухая форма ВДЖП достигает продвинутых стадий, в настоящее время нет лечения для предупреждения потери зрения. Однако специфические высокие дозы формулы антиоксидантов и цинка могут отсрочить или предупредить промежуточную стадию ВДЖП от прогрессирования до продвинутой стадии. Продукт Macugen® (инъекция пегалтаниба натрия), коагуляция лазером и фотодинамическая терапия могут контролировать патологический рост кровеносных сосудов и кровотечение в желтом пятне, что полезно для некоторых людей с влажной формой ВДЖП, однако, такими способами утраченное зрение восстановить нельзя. Если зрение уже утрачено, существует мало средств, которые могут помочь улучшить качество жизни.

Одним из ранних признаков возрастной дегенерации желтого пятна (ВДЖП) является накопление внеклеточных отложений, известных под названием «старческих бляшек», между базальным слоем пигментированного эпителия сетчатки (retinal pigmented epithelium - RPE) и базальной пластинки, также называемой оболочкой Бруха (Bruch's membrane - BM). Предшествующие исследования, выполненные Anderson и др., подтвердили, что старческие бляшки содержат амилоид бета (Experimental Eye Research 78, 2004, сс.243-256).

Современные исследования продолжают исследовать факторы внешней среды, генетические факторы и факторы питания, которые могут содействовать ВДЖП. Также исследуются новые стратегии лечения, включая трансплантаты клеток сетчатки, лекарственные средства, которые могут предупредить или понизить прогрессирование заболевания, радиационную терапию, генную терапию, имплантацию компьютерного чипа в сетчатку, которые могут помочь стимулировать зрение, и агенты, которые могут

предупредить рост новых кровеносных сосудов под желтым пятном.

Важным фактором, который рассматривают при разработке новых лекарственных средств, является легкость применения пациентами, для которых они предназначены. Средства доставки пероральных лекарственных средств, особенно таблетки, капсулы и мази, составляют до 70% от всех потребляемых лекарственных форм, поскольку они удобнее для пациентов. Разработчики лекарственных средств полагают, что пациенты предпочитают пероральное введение в большей степени, чем инъекции или другие более инвазивные формы медикаментозного введения. Также предпочтительны составы, с увеличенными интервалами дозирования (т.е. раз в сутки или составы устойчивого высвобождения). Простота введения антибиотиков в пероральной лекарственной форме приводит к повышению соблюдения пациентом режима и схемы лечения.

Необходимы эффективные способы и композиции для предупреждения или выявления осложнения, связанного с амилоидозом, группой заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна. В частности, необходимы агенты, способные противодействовать физиологическим проявлениям заболевания, например, формированию бляшек, ассоциированных с агрегированием волокон амилоида или амилоидоподобного пептида.

Сообщалось, что антиамилоидные антитела, возникшие в результате инокуляции амилоидом A β ₁₋₄₂, смешанным с полным или неполным адьювантом Фройнда, снижают амилоидную нагрузку у трансгенных мышей, связанную с болезнью Альцгеймера человека (Schenk и др., 1999). Внутривентрикулярное введение тетрапальмитоилированного A β ₁₋₁₆, помещенного в липосомы, трансгенным мышам NORBA, высвобождает существенные титры антиамилоидных антител, о которых сообщалось, что они растворяют амилоидные волокна и бляшки *in vitro* и *in vivo* (Nicolau и др., 2002).

Возможный механизм, с помощью которого происходит растворение амилоидных бляшек и волокон, впервые был предложен Bard и др. (2000), которые заключили, что опсонизированные антителами бляшки были последовательно разрушены макрофагами микроглии. De Mattos и др. (2001) установили, что моноклональное антитело, направленное против центрального домена β -амилоида, способно связывать и полностью изолировать амилоид плазмы. Они пришли к заключению, что наличие моноклональных антител в кровеносном русле смещает баланс A β между мозгом и плазмой, способствуя периферическому очищению и катаболизму вместо отложения в мозге.

Пролонгированное лечение человека антителами грызунов может привести к антиглобулиновому ответу, который выявляется примерно на 8-12 сутки после введения и достигает пика примерно на 20-30 сутки. Если такой антиглобулиновый ответ возникает, лечение должно быть прервано после не более чем примерно 10 суток, и возобновление лечения на более поздний срок обычно не допускают, поскольку оно может привести к быстрому началу вторичного антиглобулинового ответа. Хотя

антитела грызунов разделяют в значительной степени консервативную последовательность с антителами человека, имеется много отличий в последовательностях у антител грызунов и людей, достаточных для того, чтобы антитела грызунов были иммуногенными для людей.

- 5 Эта проблема может быть преодолена выработкой антител непосредственно у людей или созданием «гуманизированных» антител (также называемых «переформированными» антителами). Гуманизированные антитела имеют аминокислотную последовательность вариабельной области, которая содержит полученные от грызунов области CDR, вкрапленные в последовательности каркасных
- 10 участков человека, или последовательности, близкие к ним. Поскольку специфичность гуманизированного антитела обеспечивается полученными от грызунов областями CDR, их остатки используют в существенной степени неизменными, всего лишь с минорными модификациями, являющимися допустимыми, которые существенно не влияют на сродство и специфичность антитела в отношении его целевого антигена.
- 15 Остатки каркасного участка могут быть получены от примата, или особенно от какой-либо вариабельной области человека, или могут быть их комбинацией, и получаемая сконструированная вариабельная область может быть существенно перегруппирована.

- Для максимизации вероятности того, что сродство будет сохранено у заново собранного антитела, важно произвести правильный отбор каркасной области.
- 20 Известно, что последовательности каркасных участков способствуют поддержанию областей CDR в их точной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, и что остатки каркасных участков могут иногда даже участвовать в связывании антигена. Для поддержания сродства антитела с его антигеном полезно выбрать последовательности каркасных участков человека, которые наиболее близки
- 25 последовательностям каркасных участков грызунов. Кроме того, может понадобиться заместить одну или несколько аминокислот в последовательности каркасного участка человека соответствующим остатком в каркасном участке грызуна, чтобы избежать утраты сродства. Такому замещению может способствовать компьютерное моделирование.

- 30 Настоящее изобретение предусматривает новые способы и композиции, включающие высоко специфичные и высоко эффективные антитела, особенно химерные антитела, включая их фрагменты, более предпочтительно частично или полностью гуманизированные антитела, включая их фрагменты, способные специфически распознавать и связывать специфические эпитопы разных β -амилоидных антигенов,
- 35 которые могут быть презентированы антителу в мономерной, двухмерной, трехмерной и т.д. полимерной форме, в форме агрегата, волокон, филаментов или в конденсированной форме бляшки. Антитела по настоящему изобретению особенно применимы для лечения амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной
- 40 амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный
- 45 паралич, множественный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна, а также многие другие.

Краткое описание изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или к гуманизированному антителу или его фрагменту, которые распознают и связываются по меньшей мере с одним отдельным сайтом связывания, особенно по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания, и более предпочтительно по меньшей мере с тремя разными сайтами связывания на β -амилоидном белке, причем указанный один, указанные по меньшей мере два и указанные по меньшей мере три сайта связывания каждый включают по меньшей мере один или два последовательно расположенных аминокислотных остатка, участвующих в связывании антитела.

В частности, химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению связывает по меньшей мере два, особенно по меньшей мере три разных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем по меньшей мере два из трех разных сайтов связывания включают по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, предпочтительно участвующих в связывании антитела и по меньшей мере один из трех по разному связывающих сайта включает по меньшей мере один аминокислотный остаток.

По меньшей мере два разных сайта связывания, включающие по меньшей мере два последовательных аминокислотных остатка, преимущественно вовлеченных в связывание антитела, локализованы в тесной близости друг к другу на антигене, разделенные и/или фланкированные по меньшей мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или на существенно меньшем расстоянии по сравнению с указанными по меньшей мере двумя последовательными аминокислотными остатками, таким образом, формируя конформационный прерывистый эпитоп.

По меньшей мере три разные сайты связывания, включающие по меньшей мере два последовательных аминокислотных остатка и по меньшей мере один аминокислотный остаток, соответственно, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, локализованы в тесной близости друг к другу на эпитопе, разделены и/или фланкированы по меньшей мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или существенно меньшей протяженности по сравнению с аминокислотными остатками, которые преимущественно вовлечены в связывании антитела, таким образом формируя конформационный прерывистый эпитоп.

В частности, предусмотрены химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которые распознают и связывают по меньшей мере один отличающийся сайт, особенно по меньшей мере два разных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три разных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанный по меньшей мере один, или указанные по меньшей мере два разных сайта связывания каждый включает по меньшей мере два последовательных аминокислотных остатка, предпочтительно вовлеченных в связывание антитела, причем по меньшей мере двумя последовательными аминокислотными остатками, представляющими первый сайт связывания, являются -Phe-Phe-, встроенный в коровую последовательность (SEQ ID NO:9):

Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, Ser и Ile,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, причем указанные аминокислотные остатки Хаа₃ Хаа₄ Хаа₅ и Хаа₆ не участвуют в связывании антитела или в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Phe-Phe-.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, в которых

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но особенно Val,

Хаа₄ обозначает Ala или Val, но особенно Ala,

Хаа₅ обозначает Glu или Asp, но особенно Glu,

Хаа₆ обозначает Glu или Asp, но особенно Asp.

В частности, предусмотрены химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которые распознают и связывают по меньшей мере один отличающийся сайт, особенно по меньшей мере два разных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три разных сайта связывания на β-амилоидном белке, причем указанные отличающиеся сайты связывания включают по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательных аминокислотных остатка, соответственно, преимущественно участвующие в связывании антитела, причем по меньшей мере двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками, представляющими первый сайт связывания, являются -Phe-Phe-, и по меньшей мере одним аминокислотным остатком является -His-, встроенный в следующую коровую последовательность:

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

в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln, Lys и Arg

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asn и Gln

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln, Lys и Arg

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, Ser и Ile,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile

Хаа₇ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu и Ile,

Хаа₈ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены химерное

антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, в которых

Хаа₃ обозначает Gln или Asn, но особенно Gln,

Хаа₄ обозначает Lys

Хаа₅ обозначает Leu

Хаа₆ обозначает Val или Leu, но особенно Val,

Хаа₇ обозначает Ala или Val, но особенно Ala,

Хаа₈ обозначает Glu или Asp, но особенно Glu, и

Хаа₉ обозначает Asp или Glu, но особенно Asp.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере один отличный сайт связывания, особенно по меньшей мере два отличных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три отличных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанный по меньшей мере один или указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания каждый включают по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, предпочтительно участвующих в связывании антитела, причем по меньшей мере двумя последовательно расположенными аминокислотными остатками, представляющими второй сайт связывания, являются -Lys-Leu-, встроенный в следующую коровью последовательность (SEQ ID NO:10):

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃ в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln Lys и Arg,

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asn и Gln,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile, причем указанные аминокислотные остатки Хаа₂,

Хаа₃, не участвуют в связывании антитела или в меньшей или в существенно меньшей степени по сравнению с сайтом связывания -Lys-Leu-.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере один отличный сайт связывания, особенно по меньшей мере два отличных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три отличных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанные отличные сайты связывания включают по меньшей мере один, по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, соответственно, преимущественно участвующие в связывании антитела, причем по меньшей мере одним и по меньшей мере двумя последовательно расположенными аминокислотами, которые разделены по меньшей мере одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, преимущественно участвующими в связывании антитела, являются -His- и -Lys-Leu-, соответственно, встроенный в следующую коровью последовательность:

His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆-Хаа₇-Хаа₈- в которой

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asn и Gln,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, Ser и Ile,

Хаа₇ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

Хаа₈ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но особенно Gln,

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но особенно Val,

Хаа₄ обозначает Phe,

Хаа₅ обозначает Phe,

Хаа₆ обозначает Ala или Val, но особенно Ala,

Хаа₇ обозначает Glu или Asp, но особенно Glu, и

Хаа₈ обозначает Asp или Glu, но особенно Asp.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере два отличных сайта связывания на β-амилоидном белке, причем указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания каждый включают по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, преимущественно участвующих в связывании антитела, причем по меньшей мере две последовательно расположенные аминокислоты разделены, по меньшей мере, одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с указанными последовательно расположенными аминокислотными остатками, которыми являются -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, представляющие первый и второй сайт связывания, встроенный в следующую коровую последовательность:

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, причем

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln, Lys и Arg,

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asp и Gln,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala,

Val, Leu, Ser и Ile,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, причем указанные аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄ Хаа₅ и Хаа₆ не участвуют в связывании антитела, или участвуют в меньшей степени или в существенно меньшей степени по сравнению с -Lys-Leu- и -Phe-Phe- сайтом связывания соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере один отличный сайт связывания, особенно по меньшей мере два отличных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три отличных сайта связывания на β-амилоидном белке, причем указанные отличные сайты связывания включают по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, соответственно, преимущественно участвующих в связывании антитела, причем по меньшей мере один и по меньшей мере две последовательно расположенные аминокислоты разделены, по меньшей мере, одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которые преимущественно участвуют в связывании антитела, причем указанными аминокислотными остатками являются -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, соответственно, представляющие первый и второй сайт связывания, встроенный в следующую коровью последовательность:

His-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asp и Gln,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, норлейцина, Met, Phe и Ile,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu, Ser и Ile,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем

Хаа₂ обозначает Gln или Asp, но особенно Gln,

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но особенно Val,

Хаа₄ обозначает Ala или Val, но особенно Ala,

Хаа₅ обозначает Glu или Asp, но особенно Glu, и

Хаа₆ обозначает Asp или Glu, но особенно Asp.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере два отличных сайта на β-амилоидном белке,

причем указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания включают по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка соответственно, преимущественно участвующих в связывании антитела, причем по меньшей мере две последовательно расположенные аминокислоты разделены, по меньшей мере, одним аминокислотным остатком, не участвующим в связывании антитела, или участвующим в существенно меньшей степени по сравнению с аминокислотными остатками, которыми являются -Phe-Phe- и -Lys-Leu- соответственно, представляющие первый и второй сайт связывания, встроенные в следующую коровую последовательность:

Хаа₁-Хаа₂-Lys-Leu-Хаа₃-Phe-Phe-Хаа₄-Хаа₅-Хаа₆, в которой

Хаа₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln, Lys и Arg,

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asn и Gln,

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Val, Ala, Leu, Met, Phe, норлейцина и Ile,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Leu и Ile,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, причем указанные аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не

участвуют в связывании антитела или участвуют в меньшей или существенно меньшей степени по сравнению с -Lys-Leu- и the -Phe-Phe сайтом связывания соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем

Хаа₁ обозначает His или Arg, но особенно His,

Хаа₂ обозначает Gln или Asn, но особенно Gln,

Хаа₃ обозначает Val или Leu, но особенно Val,

Хаа₄ обозначает Ala или Val, но особенно Ala,

Хаа₅ обозначает Glu или Asp, но особенно Glu, и

Хаа₆ обозначает Asp или Glu, но особенно Asp.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое распознает и связывает по меньшей мере два отличных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания

каждый включают по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, преимущественно участвующих в связывании антитела, которыми являются -Phe-Phe-Ala-Glu-, особенно -Phe-Phe-Ala-, более предпочтительно -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, соответственно, причем указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания проявляют аминокислотную последовательность -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-, представленную в SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность His-Gln-Lys-Leu-Val-, представленную в SEQ ID NO:8 соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которое

распознает и связывает по меньшей мере один отличный сайт связывания, особенно по меньшей мере два отличных сайта связывания, более предпочтительно по меньшей мере три отличных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанные по меньшей мере один или указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания включают по меньшей мере один и по меньшей мере два последовательно расположенных аминокислотных остатка, соответственно, преимущественно участвующих в связывании антитела, которыми являются -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, и -His-, соответственно, причем указанные отличные сайты связывания встроены в аминокислотную последовательность -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-, и аминокислотную последовательность -His-Gln-Lys-Leu-Val- соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, включает сайт распознавания и связывания антигена, который распознает и связывает по меньшей мере два отличных сайта связывания на β -амилоидном белке, причем указанные по меньшей мере два отличных сайта связывания каждый включает по меньшей мере два последовательных аминокислотных остатка в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NOs: 7 и 8 соответственно, причем указанные последовательные аминокислотные остатки, особенно -Phe-Phe- и -Lys-Leu-, являются преимущественно вовлеченными в связывание β -амилоидного белка.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения сайты распознавания и связывания, описанные выше в настоящем изобретении, формируют конформационный прерывистый эпитоп, локализованный в области β -амилоидного белка между аминокислотными остатками с 12 по 24, особенно между аминокислотными остатками 14-23, более предпочтительно между аминокислотными остатками 14-20, причем по меньшей мере два отличных сайта распознавания и связывания каждый включает по меньшей мере 2 аминокислотных остатка, расположенных в положениях 16 и 17 и в положениях 19 и 20 соответственно, причем по меньшей мере один отличный сайт распознавания и связывания, включающий по меньшей мере 1 аминокислотный остаток, локализованный в положении 14, эти остатки преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка, причем указанные сайты распознавания и связывания по меньшей мере с одной стороны фланкированы аминокислотными остатками, преимущественно остатками 21 и 22, и разделены одним аминокислотным остатком, локализованным в положениях 15 и 18, эти аминокислотные остатки непосредственно не участвуют в связывании антигена, или по меньшей мере участвуют в существенно меньшей степени.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанные по меньшей мере три отличных сайта распознавания и связывания фланкированы по обеим сторонам аминокислотными остатками, особенно остатками 12 и 13, и остатками 21 и 22 и разделены одним аминокислотным остатком, локализованным в положениях 15 и 18, эти аминокислотные остатки непосредственно не участвуют в связывании антигена, или по меньшей мере участвуют в существенно меньшей степени.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные последовательно расположенные аминокислотные остатки, особенно -Lys-Leu- в положении 16 и 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20, которые преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка, встроены в следующую коровую область:

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

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные

аминокислотные остатки, особенно -Lys-Leu- в положении 16 и 17 и -Phe-Phe- в положении 19 и 20, и -His- в положении 14, которые преимущественно участвуют в связывании β -амилоидного белка, встроены в следующую коровую область:

5	Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизованное антитело или его фрагмент, который включает в вариабельной области легкой и тяжелой цепи, соответственно, по меньшей мере одну область CDR, происходящую не от человека, особенно две области CDR, происходящие не от человека, более предпочтительно три области CDR, происходящие не от человека, встроенные в одну или несколько областей каркасных участков, полученных от человека или примата, и необязательно константную область, происходящую от антитела человека или примата, причем гуманизованное антитело или его фрагмент способны специфически распознавать и связывать β -амилоидный белок, особенно β -амилоидный мономерный пептид, более предпочтительно β -амилоидный полимерный пептид, еще более предпочтительно β -амилоидные волокна, фибриллы или филаменты отдельно или в качестве части β -амилоидной бляшки, по эпитопу, включающему следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:11):

20 Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, в которой
 Xaa₁ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из His, Asn, Gln, но особенно His,
 Xaa₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asp и Gln, но особенно Gln, и
 25 Xaa₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Val, Leu и Ile, но особенно Val,
 Xaa₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala и Val, но особенно Ala,
 30 Xaa₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, но особенно Glu,
 Xaa₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, но особенно Asp.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизованное антитело или его фрагмент, которое включает в вариабельной области легкой и тяжелой цепи, соответственно, по меньшей мере одну область CDR, происходящую не от человека, особенно две области CDR, происходящие не от человека, более предпочтительно три области CDR, происходящие не от человека, встроенные в одну или несколько областей каркасного участка, происходящих от человека или примата, и необязательно константную область, происходящую от антитела человека или примата, причем гуманизованное антитело или его фрагмент способны специфически распознавать и связывать β -амилоидный белок, особенно β -амилоидный мономерный пептид, более предпочтительно β -амилоидный полимерный пептид, еще более предпочтительно β -амилоидные волокна, фибриллы или филаменты отдельно или в качестве составляющей β -амилоидной бляшки, по эпитопу, включающему следующую аминокислотную последовательность:

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, причем

Хаа₂ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asp и Gln, но особенно Gln, и

Хаа₃ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Val, Leu, и Ile, но особенно Val,

Хаа₄ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala и Val, но особенно Ala,

Хаа₅ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, но особенно Glu,

Хаа₆ обозначает аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu и Asp, но особенно Glu, причем указанные аминокислотные остатки Хаа₂, Хаа₃, Хаа₄, Хаа₅, Хаа₆ не участвуют в связывании антитела или участвуют в меньшей степени по сравнению с -His- и the -Lys-Leu- и the -Phe-Phe- сайтом связывания.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения область CDR, происходящую не от человека, получают от антитела-донора, но особенно антитела-донора мыши, сформировавшегося против фрагмента антигена, который не содержит указанного отличного сайта связывания. Это изменение в области эпитопа может быть по меньшей мере вызвано применением надмолекулярной антигенной конструкции, включающей антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, особенно β -амилоидного пептида A β ₁₋₁₆, модифицированный гидрофильной частью молекулы, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), причем указанная гидрофильная часть молекулы ковалентно связана с каждым из концов антигенного пептида через по меньшей мере одну, особенно одну или две аминокислоты, например, лизин, глутаминовую кислоту и цистеин или какую-либо другую соответствующую аминокислоту или аминокислотный аналог, способный выступать в качестве контактного устройства для соединения гидрофильной части молекулы с фрагментом пептида согласно приведенному ниже описанию настоящего изобретения в процессе иммунизации. Если ПЭГ используют в качестве гидрофильной части молекулы, свободные от ПЭГ концы ковалентно связаны с фосфатидилэтаноламином или каким-либо другим соединением, которое может функционировать в качестве заякоривающего элемента, например, для встраивания антигенной конструкции в двойной слой липосомы по описанию, приведенному в настоящем изобретении.

В частности, область CDR, происходящую не от человека, получают от антитела-донора мыши, которое проявляет специфические свойства антитела ACI-01-Ab7C2 (также называемого в настоящем описании антителом «mC2»), депонированным 01 декабря 2005 г. в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) в Брауншвейге по адресу: Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, по Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры под номером DSM ACC2750.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения область CDR, происходящую не от человека, получают от антитела-донора мыши ACI-01-Ab7C2 (также называемого в настоящем описании антителом «mC2»), депонированным 01 декабря 2005 г. в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) в Брауншвейге по адресу: Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, по Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры под номером DSM ACC2750.

Кроме того, применение липида А в качестве части протокола иммунизации может повлиять на изменение в области эпитопа.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящих из последовательности SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 варибельной области тяжелой цепи (Heavy Chain Variable Region - HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 варибельной области легкой цепи (Light Chain Variable Region - LCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, причем указанное гуманизированное антитело включает интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящих из последовательности SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 варибельной области тяжелой цепи (Heavy Chain Variable Region - HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, причем указанное гуманизированное антитело включает интегрированный в каркасные участки легкой цепи, происходящей от человека или примата, пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

Кроме того, настоящее изобретение относится к варибельной области легкой цепи (Light Chain Variable Region - LCVR), включающей интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к варибельной области тяжелой цепи (HCVR), включающей интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3 представляющей CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, которые включают интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, включающей последовательность SEQ ID NO:1, представляющую CDR1, SEQ ID NO:2, представляющую CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющую CDR3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющую CDR1, SEQ ID NO:5, представляющую CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющую CDR3 варибельной области легкой цепи (LCVR), причем одна и та же область CDR не может присутствовать в антителе дважды. В частности, если по меньшей мере две области CDR обе представляют CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), по меньшей мере одной из указанных CDR должна быть область CDR1, представленная последовательностью SEQ ID NO:4.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной

последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из последовательности SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (Heavy Chain Variable Region - HCVR), но особенно гуманизированному антителу или его фрагменту, причем одна и та же CDR не может содержаться в антителе дважды.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи (Heavy Chain Variable Region - LCVR), включающей интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2 представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3 представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированный в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из последовательности SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

Кроме того, настоящее изобретение относится к вариабельной области легкой цепи (Light Chain Variable Region - LCVR), включающей интегрированный в каркасные участки легкой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6 представляющей CDR3, вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем одна и та же область CDR не может присутствовать дважды в антителе, в частности, по меньшей мере одна из указанных областей CDR должна быть областью CDR1, представленной последовательностью SEQ ID NO:4.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, пептиды с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), особенно в указанном выше порядке.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), включающей интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, пептиды с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), особенно в указанном выше порядке.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки легкой цепи, происходящей от человека или примата, пептиды с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), особенно в указанном выше порядке.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вариабельной области легкой цепи (LCVR), включающей интегрированные в каркасные участки легкой цепи, происходящей от человека или примата, пептиды с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6,

представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), особенно в указанном выше порядке.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере три пептида с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и последовательности SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), но особенно гуманизированное антитело или его фрагмент, причем указанные одни и те же CDR не могут содержаться в антителе дважды.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере четыре пептида с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), но особенно гуманизированное антитело или его фрагмент, причем указанные одни и те же CDR не могут содержаться в антителе дважды.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки, происходящие от человека или примата, по меньшей мере пять пептидов с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR), но особенно гуманизированное антитело или его фрагмент, причем указанные одни и те же CDR не могут содержаться в антителе дважды.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему интегрированные в каркасные участки, происходящие от человека или примата, пептиды с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), или его фрагменту, причем указанное гуманизированное антитело, вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, представляющей CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к

гуманизированному антителу, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) или его фрагменту, причем указанное гуманизированное антитело, вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере один пептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, представляющей CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) или его фрагменту, причем указанное антитело, вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, и SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) или его фрагменту, причем антитело, вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, представляющей CDR1, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) или его фрагменту, причем указанное антитело, вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, представляющей CDR2, и SEQ ID NO:3, представляющей CDR3, вариабельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его фрагменту, включающему вариабельные области с каркасными участками, происходящими от человека или примата, и по меньшей мере одну область CDR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, включающей последовательность SEQ ID NO:1, представляющую CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), SEQ ID NO:2, представляющую CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и SEQ ID NO:4, представляющую CDR1 вариабельной области легкой цепи (LCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области легкой цепи (LCVR) или его фрагменту, причем антитело, вариабельная область легкой цепи (LCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, и SEQ ID NO:5, представляющей CDR2, вариабельной области легкой цепи (LCVR).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, вариабельной области легкой цепи (LCVR) или его фрагменту, причем антитело, вариабельная область легкой цепи (LCVR) или его фрагмент включает интегрированные в каркасные участки тяжелой цепи, происходящей от человека или примата, по меньшей мере два пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, представляющей CDR1, и SEQ ID NO:6,

представляющей CDR3, вариабельной области легкой цепи (LCVR).

Настоящее изобретение также предусматривает гуманизированное антитело или его фрагмент, причем и вариабельная область тяжелой цепи (HCVR), и вариабельная область легкой цепи (LCVR) антитела мыши C2 каждая вносит по меньшей мере от одной из

5 присущим им областей CDR до по меньшей мере двух областей CDR гуманизированного антитела. Таким образом, образуемое гуманизированное антитело или его фрагмент могут включать:

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1,

представляющую CDR1 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

10 SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2,

представляющую CDR2 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3,

15 представляющую CDR3 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:4, представляющей CDR1 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1,

представляющую CDR2 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:5, представляющей CDR1 (LCVR),

20 - по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2,

представляющую CDR2 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:5, представляющей CDR2 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2,

представляющую CDR2 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

25 SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1,

представляющую CDR3 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:6, представляющей CDR1 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3,

30 представляющую CDR3 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:5, представляющей CDR2 (LCVR),

- по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3,

представляющую CDR3 (HCVR) в комбинации с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO:6, представляющей CDR3 (LCVR).

35 В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагмент, или гуманизированному антителу или его фрагменту, описанному выше в настоящем изобретении, причем антитело включает константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи, происходящей от человека или примата.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к химерному

40 антителу или его фрагменту, или к гуманизированному антителу или его фрагменту, причем по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 5 аминокислотных остатков, более предпочтительно по меньшей мере один, но не более 4, еще более предпочтительно по меньшей мере один, но не более 3, но особенно предпочтительно по меньшей мере один, но не более 2 аминокислотных остатков областей CDR легкой

45 цепи и/или тяжелой цепи, согласно приведенным последовательностям SEQ ID NO:1-6, изменены путем консервативных замещений таким образом, что антитело полностью поддерживает свою функциональность.

В частности, настоящее изобретение относится к химерному антителу или его

фрагменту, или к гуманизированному антителу или его фрагменту, причем в CDR2 вариабельной области легкой цепи (LCVR), приведенной в SEQ ID NO:5, Lys в положении 50 по нумерации Kabat замещен на аминокислотный остаток из группы, состоящей из Arg, Gln и Glu, особенно Arg.

5 В частности, настоящее изобретение относится к вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем в CDR2, приведенной в SEQ ID NO:5, Lys в положении 50 по нумерации Kabat замещен на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg, Gln и Glu особенно Arg.

10 В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или к гуманизированному антителу или его фрагменту, причем в CDR2 вариабельной области легкой цепи (LCVR), приведенной в SEQ ID NO: 5, Ser в положении 53 по нумерации Kabat замещен на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Asn или Thr, но особенно Asn.

15 В частности, настоящее изобретение относится к вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем в CDR2, приведенной в SEQ ID NO:5, Ser в положении 53 по нумерации Kabat замещен на аминокислотный остаток из группы, состоящей из Asn или Thr, но особенно Asn.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, 20 причем вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% идентична последовательности SEQ ID NO:15 и 16, соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем 25 вариабельная область легкой цепи (LCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% идентична последовательности SEQ ID NO:12 и 13, соответственно.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело или его фрагмент, причем по меньшей мере две, но особенно 30 три из областей CDR вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% идентична соответствующей области CDR, обозначенной SEQ ID NO:1-3.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело или его фрагмент, причем по меньшей мере две, но особенно 35 три из областей CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 98% идентична соответствующей области CDR, обозначенной SEQ ID NO:4-6.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его 40 фрагменту по настоящему изобретению, описанным выше, причем вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, обозначенной SEQ ID NO:15 и 16, соответственно.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его 45 фрагменту по настоящему изобретению, описанным выше, причем вариабельная область легкой цепи (LCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности,

обозначенной SEQ ID NO:12 и 13, соответственно.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его фрагменту по настоящему изобретению, описанному выше, причем по меньшей мере одна область CDR, особенно по меньшей мере две области CDR, но более предпочтительно три области CDR из числа областей CDR варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеют аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, обозначенной SEQ ID NO:1-3.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его фрагменту по настоящему изобретению, описанному выше, причем по меньшей мере одна область CDR, особенно по меньшей мере две области CDR, но более предпочтительно три области CDR, из числа областей CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеют аминокислотную последовательность, которая на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, обозначенной SEQ ID NO:4-6.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу по настоящему изобретению, описанному выше, причем по меньшей мере одна из аминокислот, представляющих акцепторные последовательности каркасного участка, полученные из последовательностей V_H и V_K зародышевой линии человека, изменена, а именно замещена на аминокислоту из соответствующей области антитела ACI-01-Ab7C2 мыши или на консервативную аминокислоту.

В частности, настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором аминокислота Trp в положении 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{HIII} варибельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Leu, норлейцина, Ile, Val, Met, Ala и Phe, особенно Leu и Ile, но особенно Leu.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу, в котором Arg по положению 94 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{HIII} варибельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ser и Thr, но особенно Ser.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором Thr по положению 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{HIII} варибельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Leu, норлейцина, Ile, Val, Met, Ala и Phe, особенно Leu или Ile, но особенно Leu, и Arg по положению 94 по нумерации Kabat замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ser и Thr, но особенно Ser.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу, в котором

Gln по положению 45 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg, Gln и Asn, особенно Lys и Arg, но особенно Lys.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу, в котором Leu в положении 50 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Lys, Arg, Gln и Asn, особенно Lys и Arg, наиболее предпочтительно Lys.

Настоящее изобретение также относится к гуманизированному антителу, в котором Trp в положении 87 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Phe, Leu, Val, Ile и Ala, особенно Leu и Phe, наиболее предпочтительно Phe.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором Trp в положении 87 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Phe, Leu, Val, Ile и Ala, особенно Leu и Phe, наиболее предпочтительно Phe.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором Asn в положении 53 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, может быть замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Gln, His, Lys и Arg, но особенно His и Gln.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, в котором аминокислота Trp в положении 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{HH} вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Leu, норлейцина, Ile, Val, Met, Ala и Phe, особенно Leu и Ile, более предпочтительно Leu, и аминокислота Arg в положении 94 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{HH} вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ser и Thr, но особенно Ser, и аминокислота Trp в положении 87 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_{KH} вариабельной области легкой цепи, показанной в

SEQ ID NO:12, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Phe, Leu, Val и Ala, особенно Leu и Phe, но особенно Phe.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором аминокислота Trp в положении 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III

5 вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Leu, норлейцина, Ile, Val, Met, Ala и Phe, особенно Leu и Ile, но особенно Leu.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором аминокислота Arg в положении 94 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III

10 вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ser и Thr, но особенно Ser.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором аминокислота Trp в положении 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III

15 вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена Leu или Ile, но особенно Leu и Arg в положении 94 по Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III вариабельной области тяжелой цепи, показанной в

20 SEQ ID NO:15, замещена на Ser.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором аминокислота Tyr в положении 87 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_K II

25 вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена Phe.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу, в котором аминокислота Trp в положении 47 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III

30 вариабельной области тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO:15, замещена Leu или Ile, но особенно Leu и Arg в положении 94 по Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_H зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_H III вариабельной области тяжелой цепи, показанной в

35 SEQ ID NO:15, замещена на Ser и Tyr в положении 87 по нумерации Kabat в акцепторной последовательности каркасного участка, полученной из последовательностей V_K зародышевой линии человека из подгруппы Kabat V_K II вариабельной области легкой цепи, показанной в SEQ ID NO:12, замещена Phe.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:12.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизованное антитело, которое включает вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:12.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:13.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает всю вариабельную область легкой цепи, включая сигнальные последовательности, что показано в последовательности SEQ ID NO:13.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:12 и константную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:14.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает всю вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:13 и константную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:14.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:15.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:15.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к вариабельной области тяжелой цепи, включая сигнальные последовательности, что показано в SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает всю вариабельную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:16.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает вариабельную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:15 и константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:17.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело, которое включает всю вариабельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:16 и константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:17.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело по настоящему изобретению при инкубировании с A β мономерным пептидом, имеющим по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 35, более предпочтительно по меньшей мере 38, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, и/или с A β полимерным растворимым амилоидным пептидом, включающим множество указанных A β мономерных единиц, но особенно с A β ₁₋₄₂ мономерным и/или A β полимерным растворимым амилоидным пептидом, включающим множество указанных A β ₁₋₄₂ мономерных единиц, особенно при мольном соотношении концентраций антитела к A β ₁₋₄₂ до 1:1000, но особенно при мольном соотношении концентраций от 1:10 до 1:100, ингибирует агрегирование A β мономеров в высокомолекулярные полимерные фибриллы.

В частности, совместное инкубирование антитела по настоящему изобретению с амилоидным мономерными и/или полимерными растворимыми пептидами проводят в течение от 24-60 ч, особенно в течение 30-50 ч, более предпочтительно в течение 48

ч, но особенно предпочтительно в течение 24 ч, при температуре от 28°C до 40°C, особенно от 32°C до 38°C, но особенно предпочтительно при 37°C.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения совместное инкубирование с амилоидными мономерными и/или полимерными растворимыми амилоидными пептидами проводят в течение от 24 ч при температуре 37°C.

В частности, антитело, особенно гуманизированное антитело по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, связывается с A β ₁₋₄₂ мономерным пептидом и/или A β полимерным растворимым пептидом, включающим множество указанных A β ₁₋₄₂ мономерных единиц, и при совместном инкубировании с A β ₁₋₄₂ мономерным пептидом и/или A β полимерным растворимым амилоидным пептидом, включающим множество указанных A β ₁₋₄₂ мономерных единиц, ингибирует агрегирование A β мономеров и/или полимеров до высокомолекулярных полимерных фибрилл.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело, особенно гуманизированное антитело по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, ингибирует агрегирование A β мономеров и/или A β растворимых полимеров, включающих множество указанных A β мономерных единиц, до высокомолекулярных полимерных фибрилл по меньшей мере на 50%, особенно по меньшей мере на 60%, особенно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, но особенно предпочтительно по меньшей мере на 85-90% или более по сравнению с соответствующими мономерами амилоидных пептидов, инкубированных в буфере (контроль), при мольном соотношении концентраций антитела и A β ₁₋₄₂ до 1:1000, особенно при соотношении мольной концентрации от 1:10 до 1:100, но особенно при соотношении мольной концентрации 1:10.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело, особенно гуманизированное антитело по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, ингибирует агрегирование A β мономеров и/или A β растворимых полимеров, включающих множество указанных A β мономерных единиц, до высокомолекулярных полимерных фибрилл по меньшей мере на 30% при мольном соотношении концентраций антитела и A β ₁₋₄₂ 1:100.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело, особенно гуманизированное антитело по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, ингибирует агрегирование A β мономеров и/или A β растворимых полимеров, включающих множество указанных A β мономерных единиц, до высокомолекулярных полимерных фибрилл по меньшей мере на 80% при мольном соотношении концентраций антитела и A β ₁₋₄₂ 1:10.

Связывание антител по настоящему изобретению с описанными в настоящем изобретении амилоидными мономерными и/или полимерными пептидами, но, предпочтительно, с амилоидной формой (1-42), приводит к подавлению агрегирования мономерных и/или полимерных амилоидогенных пептидов до высокомолекулярных фибрилл или филаментов. За счет ингибирования агрегирования амилоидогенных и/или полимерных пептидов антитела по настоящему изобретению способны предотвратить или понизить формирование амилоидных бляшек, особенно амилоидной

формы (1-42), о которой известно, что она становится нерастворимой за счет изменения вторичной конформации и является значительной частью амилоидных бляшек в мозге больных животных или людей.

Способность антитела по настоящему изобретению ингибировать способность к агрегированию может быть определена каким-либо соответствующим методом, известным в данной области, В частности, ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом осадка SDS-PAGE на полученном градиенте и/или с помощью тιοфлавин Т (Th-T) флуоресцентного анализа.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителу, особенно к гуманизированному антителу по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, причем антитело при совместном инкубировании, особенно в соотношении молярных концентраций от 1:10 до 1:1000, более предпочтительно в соотношении 1:100, с предварительно сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, полученными путем агрегирования Аβ мономерных пептидов, имеющих по меньшей мере 30, особенно по меньшей мере 35, более предпочтительно по меньшей мере 38, еще более предпочтительно по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, но особенно Аβ₁₋₄₂ мономерных пептидов, способно дезагрегировать предварительно сформированные полимерные фибриллы или филаменты по меньшей мере на 20%, особенно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, но особенно по меньшей мере на 50% или более.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения подавление агрегирования и способность к дезагрегированию антителом, соответственно, определяют ультрацентрифугированием в градиенте плотности с последующим анализом осадка SDS-PAGE на полученном градиенте.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения подавление агрегирования и способность к дезагрегированию антителом, соответственно, определяют с помощью тιοфлавин Т (Th-T) флуоресцентного анализа.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению совместно инкубируют с амилоидными заранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами в течение 12-36 ч, особенно в течение 18-30 ч, более предпочтительно в течение 24 ч при температуре от 28°C до 40°C, особенно от 32°C до 38°C, более предпочтительно при 37°C.

В частности, совместное инкубирование с заранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами проводят в течение 24 ч при температуре 37°C.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителу, особенно к гуманизированному антителу по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, которое способно к дезагрегированию заранее сформированных полимерных фибрилл или филаментов по меньшей мере на 24% при молярном соотношении концентраций антитела и Аβ₁₋₄₂ 1:100.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело, особенно гуманизированное антитело по настоящему изобретению, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, которое способно к дезагрегированию заранее сформированных полимерных фибрилл или

филаментов по меньшей мере на 32% при мольном соотношении концентраций антитела и $A\beta_{1-42}$ 1:10.

За счет дезагрегирования амилоидогенных полимерных фибрилл или филаментов, антитела по настоящему изобретению способны предупреждать или снижать
5 формирование амилоидных бляшек, которые приводят к облегчению симптомов, связанных с заболеванием и задержкой или отменой его прогрессирования.

Таким образом, это еще один вариант осуществления настоящего изобретения для получения антитела, особенно гуманизированного антитела, в том числе какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, описанные в
10 настоящем изобретении, причем антитело способно понизить общее количество $A\beta$ в мозге животного, особенно млекопитающего, особенно человека с заболеванием или состоянием, приводящим к повышенной концентрации $A\beta$ в мозге.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу по настоящему изобретению, описанному выше, причем
15 антитело обладает двойной эффективностью, заключающейся в том, что оно проявляет и способность подавлять агрегирование, и способность дезагрегировать, особенно связанную с высокой степенью конформационной чувствительности.

В частности, настоящее изобретение относится к описанному выше химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его фрагменту по
20 настоящему изобретению, причем антитело при совместном инкубировании с амилоидными мономерными и/или полимерными растворимыми амилоидными пептидами, особенно с β -амилоидными мономерными пептидами, например, $A\beta$ мономерными пептидами 1-39, 1-40, 1-41 или 1-42, и/или полимерным растворимым β -амилоидным пептидом, включающим множество указанных $A\beta$ мономерных единиц,
25 но особенно с $A\beta_{1-42}$ мономерными единицами, ингибирует агрегирование $A\beta$ мономеров в высокомолекулярные полимерные фибриллы или филаменты, кроме того, при совместном инкубировании с заранее сформированными высокомолекулярными полимерными амилоидными фибриллами или филаментами, сформированными путем агрегирования амилоидных мономерных пептидов, особенно β -амилоидных мономерных
30 пептидов, например, $A\beta$ мономерных пептидов 1-39, 1-40, 1-41 или 1-42, но особенно $A\beta_{1-42}$ мономерных пептидов, способно дезагрегировать заранее сформированные полимерные фибриллы или филаменты.

Другой объект настоящего изобретения относится к описанному выше химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его фрагменту по
35 настоящему изобретению, причем антитело способно индуцировать переход конформации β -слоя в α -спираль и/или к конформации произвольной спирали, но особенно к конформации произвольной спирали, еще более предпочтительно к конформации произвольной спирали в конкретном положении в молекуле, особенно в окружении Tyr10 и Val12 белка $A\beta$, которая приводит к повышению конформации
40 произвольной спирали при расхождении конформации β -слоя и повышенной растворимости ранее сформированных высокомолекулярных полимерных амилоидных фибрилл или филаментов. В частности, количественное снижение конформации β -слоя по меньшей мере на 30%, особенно по меньшей мере на 35% и более предпочтительно по меньшей мере на 40% и более по сравнению с соответствующими ранее
45 сформированными амилоидными полимерными фибриллами или филаментами, инкубированными в буфере (контроль).

Способность антитела индуцировать перемену вторичной структуры определяют с

помощью твердотельной ^{13}C ЯМР спектроскопии, в частности, путем измерения интегральной интенсивности конформации Tyr10 и Val12 C β в пептиде A β ₁₋₄₂.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к описанному выше химерному антителу или его фрагменту, или гуманизированному антителу или его фрагменту по настоящему изобретению, включающему по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент, или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент связывается с A β мономером со связывающим сродством от по меньшей мере примерно 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 1×10^{-12} , особенно от по меньшей мере примерно 1×10^{-8} до по меньшей мере примерно 1×10^{-11} , более предпочтительно от по меньшей мере примерно 1×10^{-9} до по меньшей мере примерно 2×10^{-8} , но предпочтительно не проявляет какой-либо существенной перекрестной реакционной способности с амилоидным белком-предшественником (APP).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, которые были описаны выше в настоящем изобретении, включающее по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент, или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент связывается с A β волокном, фибриллами или филаментами со связывающим сродством, составляющим по меньшей мере примерно от 1×10^{-7} до по меньшей мере примерно 1×10^{-12} , особенно по меньшей мере примерно от 1×10^{-8} до по меньшей мере примерно 1×10^{-11} , более предпочтительно по меньшей мере примерно от 1×10^{-9} до по меньшей мере примерно 1×10^{-10} , еще более предпочтительно по меньшей мере примерно от 2×10^{-9} до по меньшей мере примерно 5×10^{-9} , но предпочтительно не проявляет какой-либо существенной перекрестной реакционной способности с амилоидным белком-предшественником (APP).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению или его фрагмент согласно приведенному выше проявляют связывающее сродство с A β волокнами, фибриллами или филаментами, которое по меньшей мере в 10 раз, особенно по меньшей мере в 15 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз, но особенно по меньшей мере в 25 раз выше, чем связывающее сродство с A β мономером.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения согласно приведенному выше описанию настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем антитело существенным образом связывается с агрегированным A β , включая бляшки A β , у млекопитающих, особенно в мозге человека, но предпочтительно не проявляет какой-либо существенной перекрестной реакционной способности с амилоидным белком-предшественником (APP).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения согласно приведенному выше описанию настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем антитело существенным образом связывается с растворимым полимерным амилоидом, особенно амилоидом β (A β), включая мономеры A β , у млекопитающих, особенно в мозге человека, но предпочтительно не проявляет какой-либо существенной перекрестной

реакционноспособности с амилоидным белком-предшественником (APP).

Также согласно приведенному выше описанию настоящего изобретения в нем предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем антитело существенным образом снижает нагрузку A β бляшек у млекопитающих, особенно в мозге человека, но предпочтительно не проявляет какой-либо существенной перекрестной реакционноспособности с амилоидным белком-предшественником (APP). Это может быть достигнуто либо связыванием антитела с бляшками, либо сдвигом равновесия между амилоидом, особенно амилоидом β (A β) в его растворимой и агрегированной форме, в сторону растворимой формы за счет дезагрегирования волокон в растворимые поли- и мономерные формы путем индукции сдвига конформации и связыванием и стабилизацией дезагрегированных и растворимых амилоидных форм, особенно форм амилоида β (A β), в ткани и/или тканевых жидкостях субъекта, включая млекопитающих и людей, особенно в мозге субъектов. Через действие антитела по настоящему изобретению периферическое очищение и катаболизм таким образом преобладает над отложением в ткани и/или тканевых жидкостях субъекта, особенно в мозге. Полезное действие антитела по настоящему изобретению таким образом может быть получено без связывания антитела с бляшками.

За счет такого стабилизирующего действия антитело по настоящему изобретению может нейтрализовывать токсические эффекты полимерного и менее агрегированного растворимого амилоидного белка, особенно амилоидного β (A β) белка, в ткани и/или тканевых жидкостях субъекта, особенно млекопитающего, и более предпочтительно человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может таким образом достичь полезных эффектов без необходимости связывать агрегированный амилоид бета в мозге субъекта.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения согласно приведенному выше описанию настоящего изобретения предусмотрено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое включает по меньшей мере одну легкую цепь или ее фрагмент или по меньшей мере одну тяжелую цепь или ее фрагмент, внедряя по меньшей мере одну, особенно две, и более предпочтительно три области CDR, полученные от антитела-донора мыши, особенно от антитела ACI-01-Ab7C2 мыши (в настоящем описании обозначаемого «mC2», а гуманизированное C2 антитело человека обозначается «hC2»), депонированного 01 декабря 2005 в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) по адресу: Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, под номером DSM ACC2750, причем указанное антитело или его фрагмент имеет сродство с A β антигеном, которое по меньшей мере в 5 раз, особенно по меньшей мере в 8 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, но особенно предпочтительно по меньшей мере в 15 раз выше по сравнению со сродством к антителу-донору мыши.

Антитело по настоящему изобретению может быть в одном из вариантов осуществления целым антителом (например, с двумя легкими цепями полной длины и двумя тяжелыми цепями полной длины) какого-либо изотипа и подтипа (например, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 и IgA2), но особенно антитело изотипа IgG4, в другом варианте в другом осуществлении настоящего изобретения оно может быть антиген-связывающим фрагментом (например, Fab, F(ab')₂, и Fv) целого антитела.

Настоящее изобретение также относится к антиген-связывающим фрагментам антитела, описанным в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fab' фрагмента, F(ab)₂ фрагмента и F_v фрагмента, включая продукты библиотеки

экспрессии Fab иммуноглобулина и эпитоп-связывающие фрагменты какого-либо антитела и фрагментов, указанных выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или антиген-связывающий фрагмент по настоящему изобретению конъюгирован с полиэтиленгликолем. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения константная область антитела по настоящему изобретению модифицирована для понижения по меньшей мере одной биологической эффекторной функции, связанной с константной областью, относительно немодифицированного антитела. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или антиген-связывающий фрагмент по настоящему изобретению включает область Fc с измененной эффекторной функцией.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидной молекуле, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, описанной выше.

В частности, настоящее изобретение относится к нуклеотидной молекуле, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую отрезок расположенных подряд аминокислотных молекул, приведенную в SEQ ID NO:2 и 3, соответственно, или комплементарную последовательность, представляющую комплементарно детерминируемые области (CDR) 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

Наиболее часто настоящее изобретение относится к нуклеотидной молекуле, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую отрезок расположенных подряд аминокислотных молекул, приведенную в SEQ ID NO:4, или комплементарную последовательность, представляющую комплементарно детерминируемую область (CDR) 1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:19, или комплементарную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность CDR 2 и CDR 3, соответственно, варибельной области тяжелой цепи (HCVR).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность, приведенную в виде SEQ ID NO:20, или нуклеотидную последовательность CDR 1 варибельной области легкой цепи (LCVR).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21, или комплементарную последовательность, кодирующую варибельную область легкой цепи.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, или комплементарную последовательность, кодирующую всю варибельную область легкой цепи, включая сигнальные последовательности.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую варибельную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:22 и константную область легкой цепи последовательности SEQ ID NO:23. Настоящее изобретение также включает комплементарную цепь указанной нуклеотидной молекулы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена

нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи. Настоящее изобретение также включает комплементарную цепь указанной нуклеотидной молекулы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25, кодирующая всю вариабельную область тяжелой цепи, включая сигнальные последовательности. Настоящее время также включает комплементарную цепь указанной нуклеотидной молекулы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена нуклеотидная молекула, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO:25 и константную область тяжелой цепи SEQ ID NO:26. Настоящее изобретение также включает комплементарную цепь указанной нуклеотидной молекулы.

К настоящему изобретению также относится нуклеотидная последовательность, которая гибридизируется с одной из нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанное выше антитело по настоящему изобретению, В частности, ее комплементарная цепь отдельно или в качестве части более крупной нуклеотидной молекулы.

В частности, настоящее изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется в обычных условиях гибридизации, особенно в жестких условиях гибридизации, с какой-либо из нуклеотидных последовательностей, приведенных в последовательностях SEQ ID NO:18-26 и 29-32, особенно к их комплементарным цепям.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, указанную в настоящем описании выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены клетки, включающие вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, указанную в настоящем описании выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции, включающей антитело по настоящему изобретению, особенно химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению и, согласно описанному выше, включающей какое-либо функционально эквивалентное антитело, или какое-либо его производное или его функциональные части, в терапевтически эффективном количестве, особенно к композиции, которая является фармацевтической или терапевтической композицией, необязательно также включающей терапевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанная композиция включает антитело в терапевтически эффективном количестве.

К настоящему изобретению также относится композиция, включающая антитело, особенно моноклональное антитело по настоящему изобретению, особенно химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, описанные выше, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или какие-либо его производные или его функциональные части, в терапевтически эффективном количестве и необязательно также биологически действующее вещество, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или эксципиент.

В частности, настоящее изобретение относится к композиции или смеси, в которых

дополнительное биологически действующее вещество является соединением, используемым в лечении амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с амилоидом или амилоидоподобным белком, например Аβ белком, вовлеченным в болезнь Альцгеймера.

5 В другом варианте осуществления настоящего изобретения другое биологически действующее вещество или соединение также может быть терапевтическим агентом, который может быть применен в лечении амилоидоза, вызванного амилоидом β, или может быть применен в лечении других нейрологических расстройств.

Другое биологически действующее вещество или соединение может проявлять
10 биологическое действие тем же или сходным механизмом в качестве антитела по настоящему изобретению, или по другому механизму действия, или с помощью множества родственных и/или неродственных механизмов действия.

Обычно к другим биологически активным соединениям могут относиться нейтрон-трансмиссионные энхансеры, психотерапевтические лекарственные средства, ингибиторы
15 ацетилхолинэстеразы, блокаторы кальциевых каналов, биогенные амины, бензодиазепиновые транквилизаторы, энхансеры синтеза, сохранности и высвобождения ацетилхолина, агонисты постсинаптического рецептора ацетилхолина, ингибиторы моноаминоксидазы-А или -В, антагонисты рецептора N-метил-D-аспартат-глутамата, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, антиоксиданты и
20 антагонисты серотинэргического рецептора.

Чаше настоящее изобретение относится к композиции или смеси, включающей по меньшей мере одно соединение из группы, состоящей из соединений, эффективных против оксидативного стресса, анти-апоптических соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, например пирензепина и метаболитов, 3-амино-1-
25 пропансульфоновой кислота, 1,3-пропандисульфоната, активаторов α-секретазы, ингибиторов β- и γ-секретазы, тау белков, нейротрансмиттеров, нарушителей β-слоев, аттрактантов для амилоид бета очищающих/истощающих клеточных компонентов, ингибиторов усеченного по N-концу амилоида бета, включая амилоид бета 3-42 в форме пироглутамата, противовоспалительных молекул или ингибиторов холинэстеразы
30 (cholinesterase inhibitor - ChEI), например, такрина, ривастигмина, донепезила и/или галантамина, агонистов M1 и других лекарственных средств, включая какой-либо амилоид или тау модифицированное лекарственное средство и пищевые добавки, и пищевые добавки вместе с антителом по настоящему изобретению, а также необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или
35 эксципиент.

Настоящее изобретение также относится к композиции или смеси, в которой соединением является ингибитор холинэстеразы (ChEI), особенно смесь, в которой соединение является выбранным из группы, состоящей из такрина, ривастигмина, донепезила, галантамина, ниацина и мемантина.

40 В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению могут включать ниацин или мемантин вместе с антителом по настоящему изобретению и необязательно с фармацевтически приемлемым носителем, и/или растворителем, и/или эксципиентом.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены
45 композиции, которые включают «атипичные антипсихотические средства», например, клозапин, ципразидон, рисперидон, арипипразол или оланзапин, для лечения положительных и отрицательных психотических симптомов, включающих галлюцинации, бред, нарушения мышления (проявляемые в форме выраженной бессвязности,

неадекватности, расстройстве ассоциативного мышления), аномального или дезорганизованного поведения, например, ангедонии, аффекта в форме уныния, апатии и социальной замкнутости у субъекта, нуждающегося в таком лечении, вместе с антителом, особенно моноклональным антителом по настоящему изобретению, но
 5 особенно химерным антителом или его фрагментом, или гуманизированным антителом или его фрагментом по настоящему изобретению, описанным в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или эксципиент.

В специфическом варианте осуществления настоящего изобретения композиции и
 10 смеси по настоящему изобретению, описанные выше в настоящем изобретении, включают антитело и биологически действующее вещество, соответственно, в терапевтически эффективном количестве.

Другие соединения, которые могут быть использованы в смесях в комбинации с антителом по настоящему изобретению, описаны в WO 2004/058258 (особенно см. сс.
 15 16 и 17), включающем мишени для терапевтических лекарственных средств (сс. 36-39), алкансульфоновые кислоты и алканосульфуровые кислоты (сс. 39-51), ингибиторы холинэстеразы (сс. 51-56), антагонисты рецептора NMDA (сс. 56-58), эстрогены (сс. 58-59), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (сс. 60-61), антиоксиданты (сс. 61-62), агонисты рецептора, активированного пролифераторами
 20 пероксисом (peroxisome proliferators-activated receptor - PPAR) (сс. 63-67), холестерин-понижающие агенты (сс. 68-75), ингибиторы амилоида (сс. 75-77), ингибиторы формирования амилоида (сс. 77-78), хелаторы металла (сс. 78-79), антипсихотики и антидепрессанты (сс. 80-82), пищевые добавки (сс. 83-89) и соединения, повышающие доступность биологически действующих веществ в мозге (см. сс. 89-93), и пролекарства
 25 (сс. 93 и 94), причем указанный документ включен в настоящее изобретение в виде ссылки.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей антитело, особенно моноклональное антитело по настоящему изобретению, но особенно химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное
 30 антитело или его фрагмент по настоящему изобретению и описанные выше в настоящем изобретении, и/или биологически действующее вещество в терапевтически эффективном количестве.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, особенно моноклонального антитела по настоящему изобретению, особенно химерного антитела
 35 или его фрагмента, или гуманизированного антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, описанного выше в настоящем изобретении, и/или его функциональной части, и/или фармацевтической композиции, или смеси, включающей указанное антитело, для получения лекарственного средства для лечения или облегчения проявлений амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием
 40 амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизма-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками
 45 амилоидного типа, например прогрессирующий супрануклеарный паралич, множественный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и

другие, включая дегенерацию желтого пятна, для субъекта, нуждающегося в таком применении.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, особенно моноклонального антитела по настоящему изобретению, предпочтительно химерного антитела или его фрагмента, или гуманизированного антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, описанных в настоящем изобретении выше, и/или их функциональной части, и/или фармацевтической композиции, или смеси, включающей указанное антитело и/или его функциональную часть, особенно в терапевтически эффективном количестве, для применения в способе предупреждения, лечения или облегчения проявлений амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна, для субъекта, нуждающегося в таком применении, включающее переработку антитела, особенно моноклонального антитела по настоящему изобретению, но особенно химерного антитела или его фрагмента, или гуманизированного антитела или его фрагмента по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой форме.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения, лечения или облегчения проявлений амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна, для субъекта, нуждающегося в таком применении, путем введения антитела и/или его функциональной части, особенно гуманизированного антитела и/или его функциональной части, предпочтительно гуманизированного антитела и/или его функциональной части, и/или композиции или смеси, включающей такое антитело и/или его функциональную часть, субъекту, включая млекопитающее или человека с указанным расстройством в терапевтически эффективном количестве.

Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), особенно заболевание или состояние, отличающееся утратой когнитивного объема памяти, у субъекта, особенно млекопитающего или человека, с указанным заболеванием или

расстройством, особенно фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ сохранения или повышения когнитивного объема памяти, особенно восстановления когнитивного объема памяти у субъекта, особенно млекопитающего или человека, с ухудшением памяти путем введения субъекту, особенно млекопитающему или человеку, нуждающемуся в этом, антитела, особенно фармацевтической или терапевтической композиции по настоящему изобретению, описанной выше.

Согласно еще одному объекту настоящего изобретения предусматривается терапевтическая композиция и способ получения такой композиции, а также способ лечения амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), особенно заболевание или состояние, отличающееся утратой когнитивного объема памяти, у субъекта, нуждающегося в этом, используя антитело по настоящему изобретению, описанное выше.

В частности, настоящее изобретение относится к лечению субъекта, особенно млекопитающего или человека, с состоянием, связанным с амилоидом, отличающееся утратой когнитивного объема памяти, которое приводит к удержанию когнитивного объема памяти.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики заболевания или состояния, связанного с амилоидом, у субъекта, включающему выявление иммуноспецифического связывания антитела или его действующего фрагмента с эпитопом амилоидного белка в образце или *in situ*, который включает следующие стадии:

(а) приведение образца, или специфической части тела, или области тела субъекта, в котором предположительно содержится амилоидный белок, в соприкосновение с антителом, особенно моноклональным антителом по настоящему изобретению, предпочтительно химерным антителом или его фрагментом, или гуманизированным антителом или его фрагментом по настоящему изобретению, описанным выше, и/или его функциональной частью, причем указанное антитело связывает эпитоп амилоидного белка,

(б) осуществления связывания антитела и/или его функциональной части с амилоидным белком для формирования иммунологического комплекса,

(в) выявления формирования иммунологического комплекса, и

(г) корреляции наличия или отсутствия иммунологического комплекса с наличием или отсутствием амилоидного белка в образце, образца, или специфической части тела, или области тела субъекта.

Также предусмотрен способ определения степени нагрузки амилоидогенных бляшек в ткани и/или жидкостях тела субъекта, нуждающегося в нем, включающее:

(а) получение образца, представляющего ткань и/или жидкостях тела исследуемого субъекта,

(б) тестирование указанного образца на наличие амилоидного белка с помощью антитела, особенно моноклонального антитела по настоящему изобретению, предпочтительно химерного антитела или его фрагмента, или гуманизированного антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, описанных выше, и/или их функциональных частей,

(в) определения количества антитела, связанного с белком, и

(г) подсчета нагрузки бляшек в ткани и/или жидкостях тела субъекта. В частности, настоящее изобретение относится к способу определения степени нагрузки

амилоидогенных бляшек в ткани и/или жидкостях тела субъекта, нуждающегося в нем, причем формирование иммунологического комплекса на стадии (в) определяют таким образом, что наличие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с наличием или отсутствием амилоидного белка.

5 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен набор для выявления и диагностики связанных с амилоидом заболеваний и состояний у субъекта, включающий антитело, особенно моноклональное антитело по настоящему изобретению, предпочтительно химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, описанное
10 выше, и/или его функциональную часть.

В частности, настоящее изобретение относится к набору для выявления и диагностики связанных с амилоидом заболеваний и состояний у субъекта, нуждающегося в этом, включающему контейнер, содержащий одно или несколько антител по настоящему изобретению, и/или его функциональную часть, и инструкции по применению антитела
15 для связывания амилоидного белка для формирования иммунологического комплекса и выявления формирования иммунологического комплекса таким образом, что наличие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с наличием или отсутствием амилоидного белка.

В другом объекте настоящего изобретения предусмотрены способы и композиции
20 для предупреждения, лечения или выявления заболевания, связанного с амилоидозом у субъекта, нуждающегося в этом, используя иммуноглобулины, согласно описанию настоящего изобретения, которые также включают вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc включает по меньшей мере одну модификацию аминокислоты относительно области Fc дикого типа. Область Fc опосредует
25 эффекторную функцию антитела или его фрагмента. С помощью модулирования способности части Fc антитела или его фрагмента связывать или активировать соответствующий рецептор, можно аннулировать или повысить эффекторную функцию антитела или его фрагмента.

Таким образом, в другом объекте настоящего изобретения предусмотрено антитело
30 или его фрагмент по настоящему изобретению, дополнительно включающее вариант области Fc, включая по меньшей мере одну мутацию аминокислоты, которая снижает эффекторную функцию. В одном таком объекте по меньшей мере одна мутация аминокислоты снижает гликозилирование антитела или его фрагмента. В другом таком объекте по меньшей мере одна мутация аминокислоты снижает связывание с
35 родственным рецептором Fc. В другом таком объекте по меньшей мере одна мутация аминокислоты снижает активирование родственного рецептора Fc по связыванию антитела или его фрагмента. В одном таком объекте вариант области Fc является вариантом области Fc IgG1. В одном из таких объектов антитело или его фрагмент включает мутацию D265A в области Fc.

40 В другом объекте настоящего изобретения предусмотрено антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, дополнительно включающий вариант области Fc, включая по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая повышает эффекторную функцию. В одном таком объекте по меньшей мере одна мутация аминокислоты повышает гликозилирование антитела или его фрагмента. В другом таком объекте по
45 меньшей мере одна мутация аминокислоты повышает связывание с родственным рецептором Fc. В другом таком объекте по меньшей мере одна мутация аминокислоты повышает активирование родственного рецептора Fc по связыванию антитела или его фрагмента. Эти и другие объекты, свойства и преимущества настоящего изобретения

станут яснее после рассмотрения подробного описания вариантов его осуществления и приводимой формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг.1 (пример 2). Вектор экспрессии тяжелой цепи химерного антитела. Фиг.2 (пример 2). Вектор экспрессии легкой цепи химерного антитела. Фиг.3 (пример 2). Кассета экспрессии вариабельной области легкой цепи мыши химерного антитела. Фиг.4 (пример 2). Кассета экспрессии вариабельной области тяжелой цепи мыши химерного антитела. Фиг.5 (пример 5.2). Сравнение вариабельной области тяжелой цепи мыши с наиболее близкой последовательностью зародышевой линии мыши. Фиг.6 (пример 8). Действие очищенного гуманизированного антитела С2. Фиг.7 (пример 9). Связывающее действие антитела, вырабатываемого кратковременной экспрессией конструкций модифицированной области CDRL2 антитела С2 в соединении с химерной тяжелой цепью антитела С2, по сравнению с химерным антителом С2ChVNAF/ChVK, вырабатываемым в результате кратковременной трансфекции, и очищенным антителом. Фиг.8 (пример 11). Результаты анализа иммуногистохимического связывания с химерным антителом AF (IgG4) и гуманизированным антителом H4K1 (IgG4). Фиг.9 (пример 12). Функциональность антитела тС2 на амилоидных волокнах. А) сравнение спектра ^{13}C CPMAS и сравнение с U- ^{13}C Tyr10 и Val12 мечеными амилоидными β 1-42 волокнами, инкубированными с ФСБ (слева в качестве контроля) или ACI-7-C2 (справа) в течение 24 ч и затем лиофилизированными. Пик при 33 частях на миллион соответствует конформации бета-слоя волокон, а пик при 30 частях на миллион является результатом конформации по типу произвольной спирали. Фиг.9 В) Сравнение соответствующих параметров для двух конформаций Val12 С β . Соответствующие химические сдвиги для двух конформаций крайне схожи, но полные интенсивности весьма различны, что отражает снижение конформаций исходного бета-слоя примерно на 35% ($1-(53.5/81.7)$), что соответствует величине, полученной в результате измерения флуоресценции. А) Сравнение ^{13}C CPMAS спектра и установка на U- ^{13}C Tyr1- и Val12 меченые амилоид β 1-42 волокна, инкубированные с ФСБ (слева, служат контролем) или ACI-7-C2 (справа) в течение 24 ч с последующим лиофилизированием. Установки для двух конформаций Val 12 С β . Показаны зеленым (слой) и синим (редкая спираль). Пик при 33 частей на миллион соответствует конформаций бета слоя волокон, а при 30 частях на миллион приводит к конформаций редкой спирали. В) Сравнение установленных параметров для двух конформаций Val 12 С β . Установленные химические сдвиги для двух конформаций очень похожи, но внутренние интенсивности сильно различаются, отражая уменьшение в исходной конформаций бета-слоя примерно на 35% ($1-(53.5/81.7)$). Это хорошо согласуется с величиной, получаемой по измерению флуоресценции. Фиг.10 (пример 12). Связывающее сродство гуманизированного С2 по данным метода ELISA. Фиг.11 (пример 14). Конформационно-специфическое связывание антитела mС2 с амилоидными белками разных классов. Получение осадка, приведенное в легенде к настоящей фигуре, относится к A β ₁₋₄₂ волокнам, получение супернатанта относится к амилоидным мономерам. Фиг.12. Гуманизированные С2 VK последовательности, сравниваемые с последовательностью мыши и акцепторными последовательностями человека DPK15 и J κ 1. Фиг.13. Гуманизированные С2 VH последовательности, сравниваемые с последовательностью мыши и акцепторными последовательностями человека DP54 и J μ 6. Фиг.14. Полная последовательность ДНК и белка вариабельной области С2 гуманизированного антитела, С2HuVK1. Фиг.15-1 - 15-5. Полная последовательность ДНК и белка константной области легкой цепи (С каппа человека)

гуманизированного C2 антитела. Фиг.16-1 - 16-2. Полная последовательность ДНК и белка константной области тяжелой цепи (IgG4 ser228-pro человека) гуманизированного C2 антитела. Фиг.17-1 - 17-3 (пример 15). Результаты экспериментов по картированию эпитопов. Фиг.17-1. hC2 связывается с пептидами 12, 13, 14, 15 и 16 из пептидной библиотеки Aβ1-42. Связывание hC2 с перекрывающимися пептидами Aβ1-42 анализируют методом ELISA. Связывание с полным пептидом Aβ1-42 и связывание с несвязываемым химерным антителом (контрольное антитело) используют в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Номер пептида соответствует аминокислоте в последовательности Aβ1-42, с которой пептид начинается.

10 Результаты представлены в виде оптической плотности (ОП). Фиг.17-2. Связывание hC2 с Абета 12-20 полностью зависит от аминокислот 16, 17, 19 и 20 и частично зависит от аминокислот 14, 15 и 18. Связывание с Абета 12-20 и аланином, замещенным с Абета 12-20, исследуют методом ELISA. Связывание с полной последовательностью Абета1-42 используют в качестве положительного контроля. Номер соответствует

15 аминокислоте, которая замещена аланином. Результаты представлены в виде оптической плотности (ОП). Фиг.17-3. Связывание hC2 с Абета 15-23 зависит от аминокислоты 23 и частично от аминокислоты 22. Связывание hC2 с Абета 13-24, 14-22 или 15-23 и с Абета21C21, 14-22A22 или 15-23A23 исследуют методом ELISA. Связывание с полной последовательностью Абета1-42 используют в качестве положительного контроля.

20 Фиг.18 (пример 13). Результаты экспериментов по изучению агрегирования. Фиг.19 (пример 13). Результаты экспериментов по изучению дезагрегирования. Фиг.20 (пример 16). Результаты экспериментов по нейропротекции с гуманизированным антителом C2.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:1. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR1) C2 HuVH AF 4 гуманизированной тяжелой цепи. SEQ ID NO:2. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR2) C2 HuVH AF 4 гуманизированной тяжелой цепи. SEQ ID NO:3. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR3) C2 HuVH AF 4 гуманизированной тяжелой цепи. SEQ ID NO:4. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR1) C2 HuVK 1 гуманизированной легкой

30 цепи. SEQ ID NO:5. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR2) C2 HuVK 1 гуманизированной легкой цепи. SEQ ID NO:6. Аминокислотная последовательность вариабельной области (CDR3) C2 HuVK 1 гуманизированной легкой цепи. SEQ ID NO:7. Аминокислотная последовательность области 2 эпитопа Aβ. SEQ ID NO:8. Аминокислотная последовательность области 1 эпитопа Aβ. SEQ ID NO:9.

35 Аминокислотная последовательность модифицированной области 2 эпитопа Aβ. SEQ ID NO:10. Аминокислотная последовательность модифицированной области 1 эпитопа Aβ. SEQ ID NO:11. Аминокислотная последовательность полностью модифицированной области эпитопа. SEQ ID NO:12. Аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи антитела C2 HuVK I. SEY ID NO:13.

40 Аминокислотная последовательность гуманизированной легкой цепи антитела C2. SEQ ID NO:14. Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи гуманизированного антитела C2. SEQ ID NO:15. Аминокислотная последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи антитела C2 HuVH AF 4. SEQ ID NO:16. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного

45 антитела C2. SEQ ID NO:17. Модифицированная область аминокислотной последовательности цепи C IG гамма-4. SEQ ID NO:18. Нуклеотидная последовательность области CDR2 вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи антитела C2 HuVH AF 4. SEQ ID NO:19. Нуклеотидная последовательность области

CDR3 варибельной области гуманизированной тяжелой цепи антитела C2 HuVH AF 4. SEQ ID NO:20. Нуклеотидная последовательность области CDR1 варибельной области гуманизированной легкой цепи антитела C2 HuVK 1. SEQ ID NO:21.

Нуклеотидная последовательность варибельной области гуманизированной легкой цепи антитела C2 HuVK 1. SEQ ID NO:22. Нуклеотидная последовательность гуманизированной легкой цепи антитела C2. SEQ ID NO:23. Нуклеотидная последовательность константной области гуманизированной легкой цепи антитела C2. SEQ ID NO:24. Нуклеотидная последовательность варибельной области гуманизированной тяжелой цепи антитела C2 HuVH AF 4. SEQ ID NO:25. Нуклеотидная последовательность гуманизированной тяжелой цепи антитела C2. SEQ ID NO:26. Нуклеотидная последовательность константной области гуманизированной тяжелой цепи антитела C2. SEQ ID NO:27. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мыши C2. SEQ ID NO:28. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мыши C2. SEQ ID NO:29. Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи антитела мыши C2. SEQ ID NO:30. Нуклеотидная последовательность легкой цепи антитела мыши C2. SEQ ID NO:31. Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела мыши C2. SEQ ID NO:32. Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела мыши C2.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

Понятия «полипептид», «пептид» и «белок» в контексте настоящего изобретения взаимозаменяемы и означают биомолекулу, состоящую из аминокислот, связанных пептидными связями. В контексте настоящего изобретения существительные в единственном числе могут означать «один или несколько» или подразумевать множественное число, если это не противоречит контексту. Выражение «заболевания и расстройства, которые вызваны или связаны с амилоидными и амилоидоподобными белками» относится к заболеваниям и расстройствам, но ими не ограничивается, которые вызваны наличием или действием амилоидоподобных белков в виде мономеров, фибрилл или полимеров или какой-либо комбинации всех трех видов. К таким заболеваниям и расстройствам относятся, но ими не ограничиваются, амилоидоз, эндокринные опухоли и дегенерация желтого пятна. Понятие «амилоидоз» относится к группе заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая, но ими не ограничиваясь, вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь ими, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), включая заболевания или состояния, характеризующиеся утратой когнитивного объема памяти, например, умеренное когнитивное нарушение (УКН), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), миозит с включенными тельцами (MBT), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, а также заболевания глаз, включая дегенерацию желтого пятна, зрительную невропатию, связанную со старческими бляшками, и катаракту, вызванную отложением бета-амилоида. Понятия «обнаружение» и «обнаруженный», применяемые в контексте настоящего изобретения, означают применение известных методик для выявления

биологических молекул, например, иммунохимических или гистологических методик, и относятся к качественному или количественному определению наличия или концентрации исследуемой биомолекулы. Понятие «полимерный растворимый амилоид» относится к составным агрегированным мономерам амилоидных пептидов, или амилоид-
 5 подобных пептидов, или модифицированных или усеченных амилоидных пептидов или других производных амилоидных пептидов, формируя олигомерные или полимерные структуры, которые растворимы в организме млекопитающего или человека, особенно в мозге, но особенно к составным агрегированным мономерам амилоида β ($A\beta$) или модифицированных или усеченных амилоидных β ($A\beta$) пептидов или его производных,
 10 которые растворимы в организме млекопитающего или человека, особенно предпочтительно в мозге. Понятия «амилоид β , $A\beta$ или β -амилоид» представляют известный в данной области термин и относятся к белкам и пептидам амилоида β , белку-предшественнику амилоида β (APP), а также к модификациям, фрагментам и каким-либо их функциональным эквивалентам. В частности, амилоид β в контексте настоящего
 15 изобретения означает какой-либо фрагмент, получаемый в результате протеолитического расщепления APP, но особенно те фрагменты, которые вовлечены или связаны с амилоидными патологиями, включая, но ими не ограничиваясь, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$; $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ $A\beta_{1-42}$ и $A\beta_{1-43}$. Структуры и последовательности амилоидных β пептидов, указанных выше, известны специалистам в данной области, а способы
 20 получения указанных пептидов или их экстракции из мозга и других тканей описаны, например, в работе Glenner, Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 1984, сс. 885-890. Кроме того, амилоидные β пептиды в различных формах также коммерчески доступны. Понятие «выделенный» означает биологическую молекулу, свободную по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она находится в природных условиях.
 25 Понятия «антитело» или «антитела» в контексте настоящего изобретения являются известными в данной области терминами и означают молекулы или действующие фрагменты молекул, которые связываются с известными антигенами, особенно молекулы иммуноглобулина, и иммунологически действующие части молекул иммуноглобулина, т.е. молекул, которые содержат сайт связывания, который специфически связывает
 30 антиген. Иммуноглобулин является белком, включающим один или несколько полипептидов, в основном кодируемых генами константных областей каппа и лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, а также бесчисленными генами переменных областей иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируют в качестве либо каппа, либо лямбда. Тяжелые цепи классифицируют на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon,
 35 которые в свою очередь представляют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Также известны подклассы тяжелой цепи. Например, тяжелые цепи IgG у людей могут относиться к какому-либо из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Иммуноглобулин по настоящему изобретению может принадлежать к какому-либо из классов (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY) или подклассов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекул иммуноглобулинов. В контексте настоящего изобретения понятие «специфически связывает» применительно к антителу означает, что антитело связывается со своим целевым антигеном с повышенным сродством по сравнению со структурно
 40 отличным антигеном (антигенами).

Известно, что типичная структурная единица иммуноглобулина представляет
 45 тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи означает переменную область примерно из 100-110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена.

Понятия вариабельной легкой цепи (V_L) и вариабельной тяжелой цепи (V_H) относятся к легкой и тяжелой цепи соответственно. Антитела представляют интактные антитела полной длины или ряд хорошо охарактеризованных фрагментов, вырабатываемых расщеплением различными пептидазами или химическими реагентами. Например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области для формирования $F(ab')_2$, представляющего димер Fab, который сам означает легкую цепь, соединенную с V_H - CH_1 дисульфидной связью. Фрагмент $F(ab')_2$ может быть редуцирован в мягких условиях для разрушения дисульфидной связи в шарнирной области, тем самым конвертируя димер $F(ab')_2$ в мономер Fab'. Мономер Fab' в основном представляет фрагмент Fab с частью шарнирной области (см. кн.: «Fundamental Immunology», 1993, под ред. W. E. Paul, изд-во Raven Press, Нью-Йорк, с более подробным описанием других фрагментов антител). Хотя различные фрагменты антител выражены в понятиях расщепления интактного антитела, специалисту очевидно, что какой-либо из различных фрагментов антител может быть синтезирован *de novo* или химически, или методом рекомбинантной ДНК. Поэтому понятие «антитело» в контексте настоящего изобретения также подразумевает фрагменты антитела, получаемые путем модификации целых антител или синтезом *de novo* антител и фрагментов, получаемых методом рекомбинантной ДНК.

В контексте настоящего изобретения понятие «антитела» в рамках охвата настоящего изобретения означает моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные, одноцепочечные, биспецифические, симинизированные, принадлежащие человеку и гуманизированные антитела, а также их действующие фрагменты. К примерам действующих фрагментов молекул, которые связываются с известными антигенами, относятся разделенные легкие и тяжелые цепи, фрагменты Fab, Fab/c, Fv, Fab' и $F(ab')_2$, включая продукты библиотеки экспрессии Fab иммуноглобулинов и эпитоп-связывающие фрагменты какого-либо антитела и фрагментов, указанных выше.

Такие действующие фрагменты могут быть получены от антитела по настоящему изобретению с помощью ряда методов. Например, моноклональные антитела могут быть расщеплены ферментом, например пепсином, и подвержены гель-фильтрации HPLC. Соответствующая фракция, содержащая фрагменты Fab, затем может быть собрана и сконцентрирована мембранной фильтрацией или другим методом. Дополнительное описание основных методов по выделению действующих фрагментов антитела см., например, работы Khaw B. A. и др. J. Nucl. Med. 23, 1982, сс. 1011-1019, Rousseaux и др. Methods Enzymology, изд-во Academic Press, 121, 1986, сс. 663-669.

Рекомбинантно полученные антитела могут быть антителами обычной полной длины, действующими фрагментами антитела, получаемыми в результате протеолитического расщепления, уникальными фрагментами действующего антитела, например, фрагментом Fv или одноцепочечным фрагментом Fv (single chain Fv - scFv), антителом с делегированным доменом и другими. Фрагмент Fv антитела имеет размер примерно 50 кДа и включает вариабельные области легкой и тяжелой цепи.

Одноцепочечный полипептид Fv (single chain Fv - scFv) является ковалентно связанным гетеродимером $VH::VL$, который может быть экспрессирован с нуклеиновой кислоты, включая VH - и VL -кодирующие последовательности, соединенные непосредственно или через пептид-кодирующий линкер. См. Huston и др. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 1988, сс. 5879-5883. Ряд структур для конверсии природно агрегированных, но химически разделенных легкой и тяжелой цепей полипептида от области V антитела в молекулу scFv, которая может сложиться в трехмерную структуру, существенным образом

близкую к структуре сайта связывания антигена. См., например, US 5091513, 5132405 и 4956778.

Комбинированный сайт относится к части молекулы антитела, которая участвует в связывании антигена. Сайт связывания антигена сформирован аминокислотными остатками N-концевых переменных (variable - V) областей тяжелой (heavy - H) и легкой (light - L) цепей. Переменные области антитела включают три в высокой степени дивергентных отрезка, называемых «гиперпеременными областями» или «комплементарно детерминируемыми областями (complementarity determining region - CDR)», которые размещены между более консервативными фланкирующими отрезками, называемыми «каркасными участками (framework regions - FR)». В молекуле антитела три гиперпеременных области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) и три гиперпеременных области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве для формирования поверхности или кармана связывания антигена. Следовательно сайт комбинирования антитела представляет аминокислоты, которые составляют области CDR антитела, и какие-либо остатки каркасного участка, которые составляют карман сайта связывания.

Специфичность аминокислотных остатков в определенном антителе, которые составляют комбинированный сайт, может быть определена известными в данной области методами. Например, области CDR антитела могут быть идентифицированы в качестве гиперпеременных областей, первоначально определенных Kabat и др. (см. кн.: E. Kabat и др. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», изд-во Министерства здравоохранения и социального обеспечения США, Johnson G., Wu T.T. Nucleic Acids Research, 29, 2001, сс. 205-206, <http://immuno.bme.nwa.edu>). Положения областей CDR также могут быть идентифицированы в качестве петлевидных структур, изначально описанных Chothia и др. (см. Chothia, Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, с.901, Chothia и др., Nature 342, 1989. с.877, Tramontane и др., J. Mol. Biol. 215. 1990, с.175). К другим способам относится «определение AbM», которое представляет компромисс между определениями Kabat и Chothia и получается в результате применения компьютерной программы моделирования антитела Oxford Molecular's AbM (которая в настоящее время обозначается «Accelrys») или «определение контакта» CDR по Macallum и др. (J Mol Biol., 262(5), 1996, сс. 732-45). Приводимая ниже схема идентифицирует области CDR по разным известным системам идентификации.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	H30 -- H35B
Нумерация по Kabat				
H1	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
Нумерация по Chothia				
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

Общепринятыми руководящими принципами, с помощью которых можно идентифицировать области CDR в антителе только из одной последовательности, являются следующие:

LCDR1:

Старт - примерно остаток 24.

Остатком впереди всегда является Cys.

Остатком сзади всегда является Trp. Обычно за TRP следует TYR-GLN, но также

может следовать LEU-GLN, PHE-GLN или TYR-LEU.

Длина составляет 10-17 остатков.

LCDR2:

Старт - 16 остатков после конца L1.

5 Последовательностью впереди обычно является ILE-TYR, но также могут быть VAL-TYR, ILE-LYS или ILE-PHE.

Полная длина состоит из 7 остатков.

LCDR3:

Старт - обычно 33 остатка после конца L2.

10 Остатком впереди является Cys.

Последовательностью после является PHE-GLY-X-GLY.

Длина составляет 7-11 остатков.

HCDR1:

Старт - примерно с остатка 26 (четыре остатка после CYS) [Chothia / AbM определение]

15 Старт по Kabat - на пять остатков позже.

Последовательностью впереди является CYS-X-X-X.

Остатком после является TRP, обычно затем следует VAL, но также может быть ILE или ALA.

Длина составляет 10-12 остатков по определению AbM, хотя по определению Chothia
20 исключены последние 4 остатка.

HCDR2:

Старт - 15 остатков после конца по определению Kabat /AbM последовательности CDR-H1.

Последовательностью впереди обычно является LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID
25 NO. 1), но также возможен ряд вариаций.

Последовательностью после является LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

Длина составляет 16-19 остатков по определению Kabat (по определению AbM короче на 7 остатков).

30 HCDR3:

Старт - 33 остатка после конца CDR-H2 (два остатка после CYS).

Последовательность впереди: CYS-X-X (обычно CYS-ALA-ARG).

Последовательность после: TRP-GLY-X-GLY.

Длина составляет 3-25 остатков.

35 Специфичность аминокислотных остатков в определенном антителе, которые находятся за пределами областей CDR, но, несмотря на это, составляют часть сайта комбинирования за счет боковой цепи, которая является частью сайта комбинирования (т.е. возможна связь через сайт комбинирования), может быть определена, используя
40 способы, известные в данной области, например, метод молекулярного моделирования и рентгенокристаллографии. См., например, Riechmann и др., Nature, 332, 1988, сс. 323-327.

Химерными являются антитела, у которых одна или несколько областей антитела происходят от одного вида животного и одна или несколько областей происходят от другого вида животного. Предпочтительное химерное антитело является антителом,
45 которое включает области от иммуноглобулина примата. Обычно известно, что химерное антитело для клинического применения людьми содержит переменные области от животного (но не от человека), например, от грызуна, вместе с константными областями от человека. Напротив, гуманизированное антитело содержит области CDR

от антитела, не от человека, с большинством или со всеми вариабельными каркасными участками от всех константных областей от иммуноглобулина человека. Обычно известно, что химерное антитело человека содержит вариабельные области от грызуна. Типичное химерное антитело человека содержит константные области тяжелой цепи человека и константные области легкой цепи человека с вариабельными областями и тяжелой, и легкой цепи, полученной от антитела грызуна. Химерное антитело может включать некоторые изменения в нативной аминокислотной последовательности константных областей человека и последовательности нативной вариабельной области грызуна. Химерное и гуманизированное антитела могут быть получены методами, известными в данной области, включая подходы к пересадке CDR (см., например, US 5843708, 6180370, 5693762, 5585089, 5530101), стратегию перетасовки цепи (см., например, US 5565332, Rader и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915), стратегии молекулярного моделирования (US 5639641) и др.

В контексте настоящего изобретения понятие «гуманизированное антитело», используемое в случае двух цепей человека, означает, что по меньшей мере одна цепь гуманизирована. Цепь гуманизированного антитела содержит вариабельную область, в которой один или несколько каркасных участков происходят от человека.

Гуманизированное антитело, являющееся одноцепочечным, представляет антитело, в котором цепь имеет вариабельную область, в которой один или несколько каркасных участков происходят от человека. Части вариабельной области, происходящие не от человека, цепи гуманизированного антитела или его фрагмента происходят не от человека, а обычно от грызуна. Вклад в гуманизированное антитело, происходящий не от человека, обычно предусмотрен в форме по меньшей мере одной области CDR, которая рассеяна среди каркасных участков, происходящих от одного (или нескольких) иммуноглобулинов человека. Кроме того, поддерживающие каркасные участки остатки могут быть изменены для сохранения связывающего сродства.

Гуманизированное антитело может дополнительно включать константные области (например, по меньшей мере одну константную область или ее часть в случае легкой цепи, и предпочтительно три константные области в случае тяжелой цепи). Если имеются константные области гуманизированного антитела, они обычно происходят от человека.

Способы получения «гуманизированного антитела» хорошо известны специалистам в данной области. (См., например, Queen и др., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 1989, сс. 10029-10032, Hodgson и др., Bio/Technology, 9, 1991, с.421).

«Гуманизированное антитело» также может быть получено с помощью нового генно-инженерного подхода, который позволяет получать поликлональные антитела типа антител человека со сформировавшимся сродством у многих животных, например, у кроликов и мышей. См., например, US 6632976.

[* разделы в этом месте замещены приведенными выше определениями]

Понятие «константная область» (constant region - CR) в контексте настоящего изобретения относится к генам константных областей иммуноглобулина. Гены константной области кодируют часть молекулы антитела, которая обуславливает эффекторные функции. Для химерных антител человека и гуманизированных антител, обычно не от человека (например, от мыши), константные области замещены константными областями человека. Константные области химерных или гуманизированных антител субъекта обычно происходят от иммуноглобулинов человека. Константная область тяжелой цепи может быть выбрана из какого-либо из пяти изотипов: альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Кроме того, тяжелые цепи различных подклассов (например, подклассов тяжелых цепей подклассов IgG)

ответственны за разные эффекторные функции и, таким образом, путем выбора определенной требуемой константной области тяжелой цепи, могут быть получены антитела с определенной эффекторной функцией. Константными областями, которые могут применяться в рамках охвата настоящего изобретения, являются гамма 1 (IgG1),
 5 особенно Fc областью гамма 1 (IgG1) изотипа, гамма 3 (IgG3) и особенно гамма 4 (IgG4). Константная область легкой цепи может быть типа каппа или лямбда, предпочтительно типа каппа. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения константная область легкой цепи является константной цепью каппа человека (Heiter и др., Cell 22, 1980, сс. 197-207) и тяжелая константная цепь является константной цепью IgG4 человека.

10 Понятие «область Fc» используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. Понятие «область Fc» может относиться к нативной последовательности области Fc или варианта области Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, область Fc тяжелой цепи иммуноглобулина человека обычно определяют в качестве отрезка от аминокислотного
 15 остатка в положении Cys226, или от Pro230 до его C-конца. Область Fc иммуноглобулина обычно включает два константных домена, CH2 и CH3.

«Функциональная область Fc» обладает «эффекторной функцией» области Fc нативной последовательности. К примерам «эффекторной функции» относятся связывание C1q, комплементарно детерминируемая цитотоксичность, связывание
 20 рецептора Fc, антитело-зависимая клеточно опосредованная цитотоксичность, фагоцитоз, пониженная регуляция рецепторов на поверхности клеток (например, рецептора В клеток - B cell receptor (BCR)) и др. Такие эффекторные функции обычно нуждаются в том, чтобы область Fc была скомбинирована со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела) и могут быть оценены, используя
 25 различные методы анализа, описанные в настоящем изобретении. Функциональная область Fc обычно включает две тяжелые цепи CH2 и CH3, содержащие полипептиды, находящиеся в связи.

«Область нативной последовательности Fc» включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc,
 30 обнаруженной в ее природных вариантах.

«Вариант области Fc» включает аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности нативной последовательности области Fc на основании по меньшей мере одной «аминокислотной модификации», согласно описанию настоящего изобретения. Предпочтительно вариант области Fc
 35 содержит по меньшей мере одно аминокислотное замещение по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, примерно от одной до примерно десяти замещенных аминокислот, предпочтительно примерно от примерно пяти аминокислотных замещений в нативной последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc в контексте
 40 настоящего изобретения может предпочтительно обеспечивать по меньшей мере примерно 80% гомологии с областью нативной последовательности Fc и/или областью Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 90% гомологии с ней, более предпочтительно по меньшей мере примерно 95% гомологии с ней.

45 Понятие «аминокислотной модификации» относится к изменению аминокислотной последовательности предопределенной аминокислотной последовательности. К примерам модификаций относятся аминокислотные замещения, инсерции и/или делеции. Предпочтительная аминокислотная модификация в контексте настоящего изобретения

является замещением.

«Аминокислотная модификация» по определенному положению, например в области Fc, относится к замещению или делеции определенного остатка, или к инсерции по меньшей мере одного аминокислотного остатка, смежного с определенным остатком.

5 Инсерция определенного «смежного» остатка означает инсерцию одного или двух остатков. Инсерция может быть N-концевой или C-концевой применительно к определенному остатку.

«Аминокислотное замещение» относится к замещению по меньшей мере одного имеющегося аминокислотного остатка в предварительно определенной аминокислотной
10 последовательности с другим отличным «замещенным» аминокислотным остатком. Замещенный остаток (остатки) может быть «природным аминокислотным остатком» (т.е. кодированным генетическим кодом) и выбранным из группы, состоящей из: аланина (Ala), аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспарагиновой кислоты (Asp), цистеина (Cys), глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина
15 (Ile), лейцина (Leu), лизина (Lys), метионина (Met), фенилаланина (Phe), пролина (Pro), серина (Ser), треонина (Thr), триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и валина (Val). Предпочтительно замещенный остаток не является цистеином. Замещение одного или нескольких не природных аминокислотных остатков также относится к понятию аминокислотного замещения в контексте настоящего изобретения.

20 Понятие «не природного аминокислотного остатка» относится к остатку, отличному от перечисленных выше аминокислотных остатков, которые могут ковалентно связывать смежные аминокислотные остатки (остаток) в полипептидной цепи. К примерам не природных аминокислотных остатков относятся норлейцин, омитин, норвалин, гомосерин и другие аминокислотные остатки, аналогичные описанным Ellman и др.,
25 Meth. Enzym. 202, 1991, сс. 301-336. Для выработки таких не природных аминокислотных остатков может быть использована методика Noren и др. Science 244, 1989, с.182, и Ellman и др., указанная выше. Вкратце, такие методики представляют химическое активирование супрессорной tРНК с остатком не природной аминокислоты с последующей транскрипцией и трансляцией РНК in vitro.

30 Понятие «аминокислотные инсерции» относится к включению по меньшей мере одной аминокислоты в заранее определенную аминокислотную последовательность. Хотя инсерция обычно состоит из инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков, в настоящем изобретении рассматриваются более крупные «пептидные инсерции», например, инсерция примерно из 3-5 и до 10 аминокислотных остатков.
35 Инсертрованные остатки (остаток) могут быть природными и не природными, описанными выше.

Понятие «аминокислотной делеции» относится к удалению по меньшей мере одного аминокислотного остатка из заранее сформированной аминокислотной последовательности.

40 Понятие «антителозависимой клеточно опосредованной цитотоксичности (ADCC)» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированное антитело связано с антигеном-мишенью, экспрессированным клетками-мишенями, и распознается рецепторами Fc (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, клетках природных киллерах - Natural Killer (NK), нейтрофилах и
45 макрофагах), благодаря которым эти цитотоксические эффекторские клетки специфически связываются для распознавания покрытых антителом клеток-мишеней и в результате убивают клетки-мишени цитотоксинами. Первичные клетки для опосредования ADCC, клетки NK, экспрессируют только Fc.gamma.RIII, поскольку

моноциты экспрессируют Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII и Fc.gamma.RIII. Экспрессия FcR на гематopoэтических клетках суммирована в табл.3 на с.464 в статье Ravetch, Kinet, Annu. Rev. Immunol 9, 1991, сс. 457-492. Для оценки действия ADCC исследуемой молекулы может быть проведен анализ ADCC *in vitro*, например, описанный в US 5500362 или 5821337. К соответствующим эффекторным клеткам для такого анализа относятся мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и клетки киллеры (NK). В другом варианте или дополнительно действие ADCC исследуемой молекулы может быть оценено *in vivo*, например, в животной модели, например, описанной Clynes и др. PNAS (USA) 95, 1998, сс. 652-656.

«Иммунными эффекторными клетками» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по меньшей мере Fc.gamma.RIII и осуществляют эффекторную функцию ADCC. К примерам лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, относятся мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), природные клетки киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, предпочтительно клетки МКПК и NK. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови, или МКПК согласно описанию в контексте настоящего изобретения.

«Комплементзависимая цитотоксичность (CDC)» относится к комплементзависимому лизису клеток-мишеней, который связан с реактивностью антитела, антиген которого экспрессируется клетками-мишенями. Активация классического метаболического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с их родственным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть проведено исследование CDC, например, описанное Gazzano-Santoro и др., J. Immunol. Methods 202, 1996, с.163.

Полипептидом с вариантом IgG Fc с «измененным» FcR связывающим сродством или ADCC действием является полипептид, который имеет либо повышенное, либо пониженное FcR связывающее действие (Fc.gamma.R или FcRn) и/или ADCC действие по сравнению с исходным полипептидом или полипептидом, включающим область Fc нативной последовательности. Вариант Fc, который «проявляет повышенное связывание» с FcR, связывает по меньшей мере один рецептор FcR с повышенным сродством по сравнению с исходным полипептидом. Улучшение связывания по сравнению с исходным полипептидом может быть примерно в 3 раза, предпочтительно примерно в 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200 и до 500 раз или примерно от 25% до 1000%.

Вариант полипептида, который «проявляет пониженное связывание» с FcR, связывает по меньшей мере один рецептор FcR с ухудшенным сродством по сравнению с исходным полипептидом. Снижение связывания по сравнению с исходным полипептидом может составлять примерно 40% или быть еще ниже. Такие варианты Fc, которые проявляют пониженное связывание с FcR, могут обладать малым или неприемлемым связыванием с FcR, например, 0-20% связыванием с FcR по сравнению с областью Fc нативной последовательности IgG, например, связыванием, описанным ниже в примерах.

Полипептид, включающий вариант области Fc, который «проявляет повышенную цитотоксичность ADCC» или опосредует антителозависимую клеточно опосредованную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно по сравнению с полипептидом, имеющим Fc IgG дикого типа, является полипептидом, который *in vitro* или *in vivo* существенно более эффективен в опосредовании ADCC, если количества полипептида с вариантом области Fc и полипептида с вариантом области Fc дикого типа, использованных в анализе, существенно те же (все другие факторы

равноценны). Обычно такие варианты могут быть идентифицированы, используя анализ ADCC *in vitro*, но также рассматриваются другие анализы или методы определения действия ADCC, например, в животной модели, и др. Предпочтительный вариант более эффективен в опосредовании ADCC примерно в 5-100 раз, например, примерно в 25-50, по сравнению с Fc дикого типа.

Понятие «моноклональное антитело» также известно в данной области и относится к антителу, которое является продуктом одной клонированной продуцирующей антитело клетки. Моноклональные антитела обычно получают путем гибридизации нормально короткоживущих клеток, антитело-продуцирующих В-клеток с быстрорастущими клетками, например, раковыми клетками (иногда называемыми «бессмертными» клетками). Образованные гибридные клетки, или гибридомы, быстро размножаются, создавая клон, который вырабатывает антитело.

Для цели настоящего изобретения понятие «моноклональное антитело» также подразумевает антитела, которые вырабатываются материнским клоном, который еще не достигает полной моноклональности.

Понятие «функционально эквивалентное антитело» в рамках охвата настоящего изобретения относится к антителу, которое существенным образом разделяет по меньшей мере одно важное функциональное свойство с указанным выше антителом, и в контексте настоящего изобретения включает: связывающую специфичность в отношении β -амилоидного белка, особенно $A\beta_{1-42}$ белка, и более конкретно в отношении области эпитопа 16-21 белка $A\beta_{1-42}$, иммунореактивность *in vitro*, подавление агрегирования мономеров $A\beta_{1-42}$ в высокомолекулярные полимерные фибриллы и/или дезагрегирования заранее сформированных полимерных фибрилл $A\beta_{1-42}$, и/или свойство разрушения β -слоя и облегчения проявлений амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна, при профилактическом или терапевтическом введении. Антитела могут принадлежать к какому-либо классу, например, IgG, IgM или IgA и др., или к какому-либо подклассу, например, IgG1, IgG2a и др., и другим подклассам, указанным выше в контексте настоящего изобретения или известным в данной области, но особенно класса IgG4. Кроме того, антитела могут быть получены каким-либо способом, например, фаговым дисплеем, или получены в каком-либо организме или линии клеток, включая бактерий, насекомых, млекопитающих или клетки и клеточные линии другого типа, которые вырабатывают антитела с желательными свойствами, например, гуманизированные антитела. Антитела также могут быть сформированы путем комбинирования части Fab и области Fc от разных видов.

Понятие «гибридизировать» в контексте настоящего изобретения относится к обычным условиям гибридизации, предпочтительно к условиям гибридизации, к которым относятся $5 \times$ SSPE, 1% SDS, 1 \times раствор Денхардта, который используют в качестве

раствора, и/или температуры гибридизации, находящиеся в интервале от 35°C до 70°C, предпочтительно 65°C. После гибридизации промывание предпочтительно проводят сначала с помощью 2 × SSC, 1% SDS и затем с помощью 0,2 × SSC при температуре от 35°C до 70°C, предпочтительно при 65°C (расшифровку SSPE, SSC и раствора Денхардта см. в статье Sambrook и др., приведенной выше). Условия жесткой гибридизации, например, описанные Sambrook и др., выше, являются особенно предпочтительными. Особенно предпочтительные условия жесткой гибридизации, например, применяют, если гибридизацию и промывку проводят при 65°C согласно указанному выше. Условия гибридизации, не являющиеся жесткими, например, с гибридизацией и промывкой проводят при 45°C или меньше, предпочтительно при 35°C или меньше.

«Гомологию» между двумя последовательностями определяют по идентичности последовательностей. Если две сравниваемые друг с другом последовательности отличаются по длине, идентичность последовательностей предпочтительно относится к проценту нуклеотидных остатков более короткой последовательности, которая идентична нуклеотидным остаткам более длинной последовательности. Идентичность последовательности обычно может быть определена с применением компьютерных программ, например, программы Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, фирма Genetics Computer Group по адресу: University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Программа Bestfit использует алгоритм гомологии Smith и Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2, 1981, сс. 482-489, чтобы установить сегмент, имеющий самую высокую идентичность двух последовательностей. При использовании программы Bestfit или другой программы выравнивания последовательностей для определения, может ли определенная последовательность иметь, например, 95% идентичность с референсной последовательностью по настоящему изобретению, параметры предпочтительно так подобраны, что процент идентичности рассчитывают по всей длине референсной последовательности, и что допустимы гомологичные гэпы до 5% от общего числа нуклеотидов в референсной последовательности. При использовании программы Bestfit так называемые необязательные параметры предпочтительно оставляют в их заранее установленных («по умолчанию») величинах. Отклонения, проявляемые при сравнении определенной последовательности с описанными выше последовательностями по настоящему изобретению, могут быть вызваны, например, путем добавления, делеции, замещения, инсерции или рекомбинации. Такое сравнение последовательностей предпочтительно также может выполняться по программе «fasta20u66» (версия 2.0u66, сентябрь 1998, предложена William R. Pearson и Университетом Вирджинии, см. также W.R. Pearson, *Methods in Enzymology* 183, 1990, сс. 63-98, приводимые в настоящем изобретении примеры и сайт <http://workbench.sdsc.edu/>). Для этой цели могут быть применены установки «параметров по умолчанию».

Антитело по настоящему изобретению может быть иммуноглобулином или антителом, о котором известно, что оно имеет каждый из сайтов связывания, который идентичен (при поливалентности), или, в другом варианте, может быть «биспецифичным» или «бифункциональным» антителом.

«Биспецифичное» или «бифункциональное антитело» является искусственным гибридным антителом, имеющим две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных сайта связывания. Биспецифичные антитела могут быть получены различными способами, включая гибридизацию гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79, 1990, сс. 315-321, Kostelny и др., *J. Immunol.* 148, 1992, сс. 1547-1553.

Понятие «фрагмент» относится к части или порции антитела или цепи антитела,

включающей несколько аминокислотных остатков по сравнению с интактным или полным антителом или цепочкой антитела. Фрагменты могут быть получены путем химической и ферментативной обработки интактного полного антитела или цепочки антитела. Фрагменты также могут быть получены методами рекомбинации. К примерам 5 фрагментов относятся фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и/или Fv. Понятие «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту полипептида иммуноглобулина или антитела, которое связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е., с интактным антителом, от которого они происходят) за связывание антигена (т.е., специфическое связывание).

10 Связывающие фрагменты получают методами рекомбинации ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, отдельные цепи и одноцепочечные антитела.

15 Понятие «фрагмент» также относится к пептиду или полипептиду, включающему аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере из 5 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 подряд расположенных аминокислотных остатков, по 20 меньшей мере 25 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 подряд расположенных аминокислотных остатков, по 25 меньшей мере 90 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 подряд расположенных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 подряд расположенных аминокислотных остатков, или по меньшей мере 250 подряд расположенных 30 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности другого пептида. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент полипептида сохраняет по меньшей мере одну функцию полипептида.

35 Понятие «антиген» относится к целому соединению или к его фрагменту, способному связываться с антителом. Иммуноген относится к антигену, который может вызвать в организме иммунный ответ, особенно у животного, более предпочтительно у млекопитающего, включая человека. Понятие «антиген» включает области, известные в качестве антигенных детерминантов или эпитопов, которые относятся к части антигена и контактируют или играют важную роль в поддержании контактного остатка в 40 антигене, ответственном за антигенность, или антигенных детерминантах.

В контексте настоящего изобретения понятие «растворимый» означает частичную или полную растворимость в водном растворе.

45 Также в контексте настоящего изобретения понятие «иммуногенный» относится к веществам, которые вызывают выработку антител, Т-клеток и реактивных иммунных клеток, направленных против антигена иммуногена.

Иммунный ответ происходит, когда индивидуум производит достаточное количество антител, Т-клеток и других реактивных иммунных клеток против введенной иммуногенной композиции настоящего изобретения для ослабления или облегчения расстройства, подвергаемого лечению.

Понятие «иммуногенности» в контексте настоящего изобретения относится к измерению способности антигена вызывать иммунный ответ (гуморальный или клеточный) при введении реципиенту. Настоящее изобретение относится к подходам, которые снижают иммуногенность химерных или гуманизированных антител человека у субъекта.

Гуманизированное антитело с пониженной иммуногенностью относится к гуманизированному антителу, проявляющему пониженную иммуногенность относительно родительского антитела, например, антитела мыши.

Гуманизированное антитело, которое в существенной степени сохраняет связывающие свойства родительского антитела, относится к гуманизированному антителу, которое сохраняет способность специфически связывать антиген, распознаваемый исходным антителом, используют для получения такого гуманизированного антитела.

Предпочтительно гуманизированное антитело может проявлять те же или в существенной степени те же антигенсвязывающее сродство и авидность, что и исходное антитело. В идеале сродство антитела может быть не менее 10% от сродства исходного антитела, более предпочтительно не менее чем примерно 30%, и наиболее предпочтительно сродство не менее 50% исходного антитела. Способы определения антигенсвязывающего сродства известны в данной области и включают определение половины максимального связывания, анализ конкурентного связывания и анализ Scatchard. Соответствующие антигенсвязывающие исследования описаны в настоящей заявке.

Понятие «обратная мутация» означает мутацию, внедренную в нуклеотидную последовательность, которая кодирует гуманизированное антитело, мутация приводит к аминокислоте, соответствующей аминокислоте в исходном антителе (например, антителе-доноре, например, антителе мыши). Определенные остатки из каркасного участка исходного антитела могут быть сохранены во время гуманизирования антитела по настоящему изобретению для существенного сохранения связывающих свойств исходного антитела, но одновременно происходит минимизирование потенциальной иммуногенности получаемого антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения исходное антитело происходит от мыши. Например, обратная мутация изменяет остаток в каркасной области человека на исходный остаток мышиног антитела. К примерам остатков каркасной области мыши, которые могут обратно мутировать, относятся, но ими не ограничиваются, канонические остатки, остатки поверхности раздела, необычные исходные остатки, которые близки к сайту связывания, остатки в «зоне Vernier» (которая формирует платформу, на которой сохраняются области CDR) (Foote, Winter, J. Mol. Biol. 224, 1992, сс. 487-499), и те, которые близки к CDR H3.

В контексте настоящего изобретения понятие «консервативное изменение» относится к изменениям, которые в существенной степени конформационно и антигенно нейтральны, производя минимальные изменения в третичной структуре мутантных полипептидов, или производя минимальные изменения в антигенных детерминантах мутантных полипептидов, соответственно по сравнению с нативным белком.

Применительно к антителам и фрагментам антител по настоящему изобретению консервативное изменение означает аминокислотное замещение, которое не изменяет способности антитела связываться с рецептором субъекта. Специалист в данной области может прогнозировать, какие аминокислотные замещения могут быть получены при поддержании высокой вероятности поддержания конформационной и антигенной нейтральности. Такой подход предусмотрен, например, в публикациях Berzofsky, Science

229, 1985, сс. 932-940, и Bowie и др., Science 247, 1990, сс. 1306-1310. К факторам, которые рассматривают в качестве влияющих на возможность поддерживать конформационный и антигенный нейтралитет, относятся, но ими не ограничиваются: (а) замещение гидрофобных аминокислот менее вероятно влияет на антигенность, поскольку гидрофобные остатки более вероятно локализованы во внутренней части белка, (б) замещение физически и химически сходно, аминокислоты менее вероятно влияют на конформацию, поскольку замещенные аминокислоты структурно подражают нативным аминокислотам, и (в) изменение эволюционно консервативных последовательностей предположительно отрицательно влияет на конформацию, поскольку такая консервативность означает, что аминокислотные последовательности могут иметь важное значение для проявления функциональности. Специалист в данной области может оценить изменения конформации белка, используя известные методы, например, но ими не ограничиваются, методы фиксации микросохранений (Wasserman и др., J. Immunol. 87, 1961, сс. 290-295, Levine и др., Meth. Enzymol. 11, 1967, сс. 928-936) и методы анализа связывания, используя конформационнозависимые моноклональные антитела (Lewis и др., Biochem. 22, 1983, сс. 948-954).

Кроме того, понятие «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, которое при введении человеку или животному достаточно для получения терапевтического эффекта у указанного человека или животного.

Эффективное количество легко определить специалисту в данной области с помощью рутинных процедур.

В контексте настоящего изобретения понятия «лечение» и «предупреждение» относятся к предупреждению рецидива или начала проявления одного или нескольких симптомов расстройства у субъекта, возникающего в результате введения

профилактического или терапевтического агента.

Конструирование гуманизированных антител

Настоящее изобретение может быть легче понято с помощью ссылки на нижеследующее подробное описание специфических вариантов осуществления настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные подробности определенных вариантов его осуществления, их не следует рассматривать в качестве ограничений при рассмотрении настоящего изобретения.

Настоящее изобретение предусматривает новые способы и композиции, включающие высокоспецифичные и высокоэффективные антитела, способные специфически распознавать и связываться со специфическими эпитопами из числа β -амилоидных антигенов. Антитела, которые могут быть получены с помощью способов настоящего изобретения, особенно применимы для лечения амилоидоза - группы заболеваний и расстройств, связанных с формированием амилоидных бляшек, включая вторичный амилоидоз и возрастной амилоидоз, включая, но ими не ограничиваясь, неврологические расстройства, например, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция о.Гуам, а также другие заболевания, которые основаны или связаны с белками амилоидного типа, например, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли и другие, включая дегенерацию желтого пятна,

которые являются примерами подобных заболеваний и расстройств.

Полностью гуманизированной или переформированная переменная область по настоящему изобретению может быть создана в рамках охвата настоящего изобретения, во-первых, конструированием переменной области аминокислотной

5 последовательности, которая содержит области CDR, полученные не от человека, предпочтительно от грызуна, особенно предпочтительно полученные от антитела мыши ACI-01-Ab7C2 (называемого антителом «mC2» в настоящем изобретении, которое было депонировано 01 декабря 2005 в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) по адресу: Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124
10 Braunschweig, в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, под номером DSM ACC2750), встроенные в последовательности каркасных участков, производных от антитела человека. Области CDR, производные не от человека, особенно от грызуна, которые могут быть получены от антитела по настоящему изобретению,
15 предусматривают требуемую специфичность. Следовательно, остатки являются включенными в конструкцию переформированной переменной области в значительной степени неизменными. Какие-либо модификации, таким образом, могут быть сведены к минимуму, и тщательно контролируются изменения в специфичности и сродстве антитела. С другой стороны, теоретически остатки каркасных участков могут быть
20 производными от какой-либо переменной области человека.

Для создания переформированного антитела, которое показывает приемлемое, и даже повышенное сродство, должны быть выбраны последовательности каркасного участка человека, которые равно применимы для создания переформированной переменной области и для сохранения сродства антитела.

25 Для достижения указанной цели была разработана оптимальная стратегия. Известно, что последовательности каркасного участка призваны поддерживать области CDR в правильной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, и что остатки каркасного участка могут иногда даже участвовать в связывании антигена, эта стратегия направлена на минимизирование изменений, которые могут отрицательно
30 воздействовать на трехмерную структуру антитела, путем изменения последовательности каркасного участка человека, применяемой для переформирования антитела из переменной области человека, которая наиболее гомологична или сходна с переменной областью, происходящей не от человека, особенно от грызуна. Это также может сделать максимальной вероятность того, что сродство может сохраниться в
35 переформированном антителе.

В самом простом варианте «оптимальная» стратегия включает сравнение V-области грызуна-донора со всеми известными аминокислотными последовательностями V-области человека, и затем отбор наибольшей гомологии для обеспечения акцепторных каркасных участков для проведения гуманизирования. В реальности имеется несколько
40 других факторов, которые следует учитывать, и которые могут влиять на конечный отбор акцепторных каркасных участков. В связи с этим могут быть применены прогнозы молекулярного моделирования в экспериментальной работе в попытке максимизации сродства получаемого переформированного антитела. По существу, цель моделирования заключается в прогнозировании того, какие ключевые остатки (если они есть)
45 большинства гомологичных каркасных участков человека следует оставить, как и у грызуна, для получения наилучшего сродства в переформированном антителе.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения области CDR получают из мышинового моноклонального антитела, особенно из мышинового моноклонального

антитела ACI-01-Ab7C2 (называемого в настоящем изобретении «mC2»), описанного в одновременно подаваемой заявке на патент EP 05 02 7092.5, поданной 12.12.2005, описание которой включено в настоящее изобретение в виде ссылки.

Клетки гибридомы FP-12H3-C2, вырабатывающие мышинное моноклональное антитело ACI-01-Ab7C2 (называемое в настоящем изобретении «mC2» и «hC2» для гуманизированного C2 антитела), были депонированы 01 декабря 2005 в связи с находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявкой EP05027092.5 в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) по адресу: Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, под номером DSM ACC2750.

Мышиное антитело может сформироваться против надмолекулярной антигенной конструкции, включающей антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, особенно β -амилоидного пептида $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ и $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, модифицированного гидрофобной частью молекулы, например, пальмитиновой кислотой или гидрофильной частью молекулы, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), или комбинацией обоих, причем гидрофобные и гидрофильные части молекулы, соответственно, ковалентно связаны с каждым из концов антигенного пептида через по меньшей мере одну, особенно одну или две аминокислоты, например, лизин, глутаминовую кислоту и цистеин, или какую-либо другую соответствующую аминокислоту или аминокислотный аналог, способные выступить в качестве связующего механизма для соединения гидрофобной и гидрофильной частей с пептидным фрагментом. Если ПЭГ используют в качестве гидрофильной части молекулы, свободный от ПЭГ конец ковалентно связан с фосфатидилэтаноламином или каким-либо другим соединением, способным функционировать в качестве элемента заякоривания, например, для внедрения антигенной конструкции в двойной слой липосомы.

В частности, мышинное антитело может сформироваться против надмолекулярной антигенной конструкции, включающей антигенный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности β -амилоидного пептида, особенно β -амилоидного пептида $A\beta_{1-16}$, модифицированного гидрофильной частью молекулы, например, гидрофильной частью молекулы полиэтиленгликолем (ПЭГ), ковалентно связанным с каждым из концов антигенного пептида через по меньшей мере одну, особенно одну или две аминокислоты, например, лизин, глутаминовую кислоту и цистеин, или какую-либо другую соответствующую аминокислоту или аминокислотный аналог, способные выступить в качестве связующего механизма для соединения гидрофобной и гидрофильной частей с пептидным фрагментом. Если ПЭГ используют в качестве гидрофильной части молекулы, свободный от ПЭГ конец ковалентно связан с фосфатидилэтаноламином или каким-либо другим соединением, способным функционировать в качестве элемента заякоривания, например, для внедрения антигенной конструкции в двойной слой липосомы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрено химерное антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент, которые включают в вариабельную область по меньшей мере одну область CDR, происходящую не от человека, встроенную в одну или несколько областей каркасного участка, производных от человека или примата, и комбинированную с константной областью, производной от антитела человека или примата, причем указанное химерное

антитело или его фрагмент, или гуманизированное антитело или его фрагмент способно специфически распознавать и связывать β -амилоидный мономерный пептид.

Области CDR содержат остатки, которые наиболее вероятно связывают антиген, и которые должны сохраниться в переформированном антителе. Области CDR определены по последовательности, классифицированной по Kabat и др. В кн.: «Sequence of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5 изд., министерство здравоохранения и социального развития, правительство США. Области CDR относятся к каноническим классам (Chothia и др., Nature, 342, 1989, сс. 877-883), в которых ключевые остатки определяют по большой протяженности структурной конформации петли CDR. Эти остатки почти всегда сохраняются в переформированном антителе.

В процессе приготовления гуманизированного антитела по настоящему изобретению, аминокислотные последовательности варьируемых областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела C2 (V_H и V_K) сравнивают с последовательностями V_H и V_K антитела грызуна в базах данных NCBI и Kabat.

Наиболее плотно совпадающим геном зародышевой линии мыши с C2 V_K является ген bb1, локус MMU231201 (Schable и др., 1999). Сравнение показывает, что имеются отличия по двум аминокислотам в от этой последовательности зародышевой линии, причем обе локализованы в CDRL1. Могут быть обнаружены зрелые антитела мыши со сходной, но не идентичной, последовательностью. Некоторые имеют идентичную последовательность CDRL2 и идентичную последовательность CDRL3, но область CDRL1 антитела C2 представляется уникальной. Сравнение с V_K последовательностями зародышевой линии человека показывает, что гены из подгруппы V_{KII} наилучшим образом спариваются с C2 V_K (Cox и др., 1994). Таким образом, последовательность C2 V_K может быть оценена по последовательности подгруппы MuV_{KII} по Kabat.

DPK15 вместе с областью J антитела HuJ_K1 может быть выбрана для обеспечения последовательностей акцепторного каркасного участка для гуманизированной области V_K .

Остатки на границе варьируемой легкой и тяжелой цепи определены (Chothia и др., J. Mol. Biol., 186, 1985, сс. 651-663). Они обычно сохраняются в переформированном антителе. Аминокислота Phe в положении 87 в C2 V_K мыши обычно не располагается на границе раздела, где Tyr более обычен в подгруппе V_{KII} , показывая, что этот остаток каркасного участка может быть важным для действия антитела. Остаток Tyr в положении 87 присутствует в зародышевой линии человека и гуманизированной области C2VK.

Последовательности гуманизированной области V_K таким образом могут быть сконструированы таким образом, что C2HuVK1 состоит из областей CDR мышиногo C2 V_K с каркасными участками DPK 15 мыши и J_K1 человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения остатки мыши могут быть замещены в области каркасного участка человека по положениям 45, и/или 87, и/или 50 и/или 53. Остаток 45 может быть вовлечен в поддержание конформации областей CDR. Остаток 87 локализован по границе доменов V_H и V_K . Следовательно, эти остатки могут быть принципиально важными для поддержания связывания антитела.

Наиболее тесное спаривание гена зародышевой линии мыши C2 V_H AF является ген VH7183, локус AF120466, (Langdon и др., 2000). Сравнение с последовательностями V_H зародышевой линии человека показывает, что гены из подгруппы V_{HI} наилучшим

образом спариваются с C2 V_H. C2 V_H AF может быть отнесен к подгруппе MuV_HIII по Kabat. Последовательность DP54 вместе с областью J в HuJ_H6 человека может быть выбрана для получения последовательностей акцепторного каркасного участка для гуманизированной области V_H.

Сравнение показывает, что имеется девять аминокислотных отличий между последовательностями C2 V_H и акцепторной последовательностью зародышевой линии человека DP54, и J_H6 в большинстве случаев локализована в CDRH2. Обнаружены зрелые антитела мыши с идентичной или сходной (отличие в один остаток) областью CDRH1 или со сходной CDRH2 (отличие в один остаток), но ни одной области из трех областей CDR, идентичных C2 V_H AF. Область CDRH3 в антителе C2 обычно короткая, состоящая только из трех остатков. Однако другие антитела обнаружены в базе данных по областям CDRH3 указанной длины. Остаток 47 в C2 V_H является скорее Leu, а не более распространенным Trp, и остаток 94 является скорее Ser, а не в норме Arg, показывая, что эти остатки каркасного участка могут быть важны для действия антитела.

Могут быть сконструированы различные гуманизированные последовательности V_H. C2HuVH1 состоит из C2 V_H AF CDR с каркасными участками из DP54 и HuJ_H6. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения остатки мыши могут быть замещены в каркасном участке человека по положениям 47, или 94, или по обоим. Остаток 47 в каркасном участке 2 осуществляет контакт и с областями CDR, и с доменом V_K. Остаток 94 может быть вовлечен в поддержку конформации областей CDR. Следовательно, эти остатки могут быть критическими для поддержания связывания антитела.

Могут быть сконструированы различные области HCVR и LCVR, которые включают области CDR не от человека, получаемые от антитела-донора, например, антитела мыши, встроенного в нативную или модифицированную область каркасного участка, производного от человека или примата. Модификация может особенно касаться замены одного или нескольких аминокислотных остатков в каркасном участке на остатки, полученные не от человека, особенно на остатки мыши, более часто обнаруживаемые в положении в соответствующих подгруппах, или на остатки, которые обладают сходными свойствами с остатками, чаще обнаруживаемыми в этом положении в соответствующих подгруппах.

Модификация последовательностей каркасного участка области каркасного участка призваны поддержать области CDR в их правильной пространственной ориентации для взаимодействия с антигеном, причем остатки каркасного участка могут иногда даже участвовать в связывании антигена. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения проводят измерения по дальнейшей адаптации выбранных каркасных участков человека, чтобы сделать их наиболее схожими с поверхностями каркасных участков грызунов для максимизации вероятности того, что сродство может быть сохранено в восстановленном антителе.

Таким образом, остатки грызунов в области каркасного участка человека могут быть замещены. В частности, остатки грызунов могут быть замещены в каркасном участке вариабельной области тяжелой цепи человека (HCVR) в положениях 47, или 94, или в обоих положениях, а также в каркасном участке вариабельной области легкой цепи человека (LCVR) в положениях 45, и/или 87, и/или 50, и/или 53, соответственно.

Остатки, выявленные в указанных выше положениях в каркасном участке человека,

могут быть заменены на остатки мыши, наиболее часто выявляемые в указанных положениях в соответствующих подгруппах. В частности, аминокислота Trp в положении 47 по Kabat в каркасном участке вариабельной области тяжелой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:15, может быть замещена на Leu или на аминокислотный остаток, который имеет сходные признаки, и замещение которого приведет к изменениям, которые в существенной степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения в третичной структуре мутантных полипептидов, или получая изменения в антигенных детерминантах. В частности, аминокислота Trp в положении 47 по Kabat в каркасном участке вариабельной области тяжелой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:15, может быть дополнительно замещена аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из норлейцина, Ile, Val, Met, Ala, и Phe, особенно Ile. Другие консервативные замещения могут быть рассмотрены, которые конформационно и антигенно нейтральны.

Аминокислота Arg в положении 94 по Kabat в каркасном участке вариабельной области тяжелой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:15, может быть замещена на Ser или на аминокислотный остаток со сходными свойствами, замещение которого приводит к изменениям, которые в существенной степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения в антигенных детерминантах. В частности, Arg в положении 94 по Kabat в каркасном участке вариабельной области тяжелой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:15, может быть в другом варианте замещена на Thr.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения оба остатка могут быть замещены в гуманизованном антителе.

Аминокислота Gln в положении 45 по Kabat в каркасном участке вариабельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на Lys или на аминокислотный остаток со сходными свойствами, замещение которого приводит к изменениям, которые в существенной степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения в третичной структуре мутантных полипептидов, или получая минимальные изменения в антигенных детерминантах. В частности, аминокислота Gln в положении 45 по Kabat в каркасном участке вариабельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть в другом варианте замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Arg, Gln и Asn, особенно Arg.

Аминокислота Leu в положении 50 по Kabat в каркасном участке вариабельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на Lys или на аминокислотный остаток со сходными свойствами, замещение которого приводит к изменениям, которые в существенной степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения в третичной структуре мутантных полипептидов, или получая минимальные изменения в антигенных детерминантах. В частности, аминокислота Leu в положении 50 по Kabat в каркасном участке вариабельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Arg, Gln и Asn, особенно Arg.

Аминокислота Asn в положении 53 по Kabat в каркасном участке вариабельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на His и Gln или на аминокислотный остаток со сходными свойствами, замещение которого приводит к изменениям, которые в существенной степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения

в третичной структуре мутантных полипептидов, или получая минимальные изменения в антигенных детерминантах. В частности, аминокислота Asn в положении 53 по Kabat в каркасном участке варибельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на аминокислоту,

5 выбранную из группы, состоящей из Gln, His, Lys и Arg.

Аминокислота Thr в положении 87 по Rabat в каркасном участке варибельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO: 12, может быть замещена на Phe или на аминокислотный остаток со сходными свойствами, замещение которого приводит к изменениям, которые в существенной

10 степени конформационно или антигенно нейтральны, получая минимальные изменения в третичной структуре мутантных полипептидов, или получая минимальные изменения в антигенных детерминантах. В частности, аминокислота Tyr в положении 87 по Kabat в каркасном участке варибельной области легкой цепи, производном от человека или примата, показанном в SEQ ID NO:12, может быть замещена на аминокислоту,

15 выбранную из группы, состоящей из Leu, Val, Ile и Ala, особенно Leu.

Полученная таким образом варибельная область, включающая по меньшей мере одну область CDR, происходящую не от человека, которая встроена в один или несколько каркасных участков, производных от человека или примата, затем может быть скомбинирована с константной областью, производной от антитела человека или

20 примата, особенно с константными областями IgG4 или к человека, соответственно. Константная область IgG4 может быть модифицирована, например, заменяя серин в положении 228 в шарнирной области на пролин (HuIgG4 Ser-Pro). Такая мутация стабилизирует межцепочечную дисульфидную связь и предупреждает формирование половинок молекул, что возможно в препаратах нативного IgG4 человека. Константная

25 область IgG4 может быть дополнительно модифицирована делецией концевого Lys в положении 439, показанном в SEQ ID NO:16.

Модифицированные варибельные области могут быть сконструированы методом, известным в данной области, например перекрывающейся ПЦР рекомбинацией.

Экспрессирующие кассеты для химерного антитела, C2 ChV_H AF и C2 ChV_K, могут

30 быть применены в качестве матриц для мутагенеза каркасных участков в требуемые последовательности. Наборы пар мутагенных праймеров синтезируют, включая области, подвергаемые изменению. Полученные гуманизированные V_H и V_K экспрессирующие кассеты могут быть клонированы в соответствующих векторах клонирования, известных в данной области, например, pUC19. После подтверждения, что целая

35 последовательность ДНК соответствует V_H и V_K, модифицированные гены V-области тяжелой и легкой цепи могут быть исключены из вектора клонирования в качестве кассет экспрессии и переносят на соответствующие векторы экспрессии.

Мутирование области Fc

40 Настоящее изобретение предусматривает методы получения варианта полипептида, особенно антитела, включающего область варианта. Такое антитело включает, например, вариант области Fc, и может применяться для лечения заболевания или расстройства, например, амилоидоза.

«Исходный», «стартовый» или «безвариантный» полипептид получают, используя

45 методы, применяемые в данной области для получения полипептидов, включающих, например, область Fc. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения исходный полипептид является антителом, а примеры методов получения антитела более подробно описаны в последующих разделах. Исходный полипептид,

однако, может быть каким-либо другим полипептидом, включающим область Fc region, например, иммуноадгезином. Способы получения иммуноадгезинов более подробно рассмотрены ниже.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант области Fc может быть выработан способами, описанными в настоящем изобретении, и такой «вариант области Fc» может быть гибридизирован с гетерологичным полипептидом выбора, например, вариабельным доменом антитела или связывающим доменом рецептора, или лигандом.

Исходный полипептид включает область Fc. Обычно область Fc исходного полипептида может включать нативную последовательность области Fc, и предпочтительно нативную последовательность области Fc человека. Однако область Fc исходного полипептида может иметь одно или несколько изменений или модификаций в имеющейся аминокислотной последовательности из области Fc нативной последовательности. Например, способность области Fc связывать C1q может быть ранее изменена (другие типы модификаций области Fc подробнее описаны ниже). В другом варианте осуществления настоящего изобретения область Fc исходного полипептида является «умозрительной» и, хотя она физически не существует, специалист по конструированию антител может принять решение по желаемой аминокислотной последовательности варианта области Fc и получить полипептид, включающий эту последовательность или ДНК, кодирующую требуемый вариант аминокислотной последовательности области Fc.

Однако в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая область Fc исходного полипептида, доступна, и такая последовательность нуклеиновой кислоты изменена для получения варианта последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант D265A области Fc.

ДНК, кодирующую вариант аминокислотной последовательности стартового полипептида, получают разными методами, известными в данной области. К этим методам относятся, но ими не ограничиваются, получение сайт-направленным мутагенезом (или ологонуклеотид-опосредованным), ПЦР-мутагенезом и кассетным мутагенезом ранее полученной ДНК, кодирующей полипептид.

Сайт-направленный мутагенез - предпочтительный способ для получения замещенных вариантов. Этот способ известен в данной области (см., например, Carter и др., *Nucleic Acids Res.* 13, 1985, сс. 4431-4443, и Kunkel и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1987, с.488). Вкратце, при выполнении сайт-направленного мутагенеза ДНК стартовую ДНК изменяют первым гибридизированием олигонуклеотида, кодирующего требуемую мутацию, с одной цепью такой стартовой ДНК. После гибридизации ДНК-полимеразу используют для синтеза целой второй цепи, используя гибридизированный олигонуклеотид в качестве праймера, и используя одну цепь стартовой ДНК в качестве матрицы. Таким образом, олигонуклеотид, кодирующий требуемую мутацию, внедряют в получаемую двухнитевую ДНК.

ПЦР-мутагенез также применим для получения вариантов аминокислотной последовательности стартового полипептида. См. Higuchi в кн.: «PCR Protocols», 1990, изд. Academic Press, сс. 177-183, и Vallette и др., *Nuc. Acids Res.* 17, 1989, сс. 723-733. Вкратце, если используют малые количества матричной ДНК в качестве стартового материала в ПЦР, праймеры, мало отличающиеся по последовательности от соответствующей области в матричной ДНК, могут применяться для получения относительно больших количеств специфического фрагмента ДНК, который отличается от последовательности матрицы только по положениям, в которых праймеры

отличаются от матрицы.

Другой способ получения вариантов - кассетный мутагенез, основан на методе, описанном Wells и др., Gene 34, 1985, сс. 315-323. Стартовым материалом является плаزمид (или другой вектор), включающая ДНК стартового полипептида, подвергаемого мутированию. Кодон (кодоны) в стартовой ДНК, подвергаемые мутированию, идентифицированы. Должен быть уникальный сайт для эндонуклеазы рестрикции на каждой стороне идентифицированного сайта (сайтов) мутирования. Если сайтов рестрикции нет, они могут быть получены с помощью указанного выше метода олигонуклеотид-опосредованного мутагенеза для их внедрения по определенным местам в ДНК стартового полипептида. Плазмидную ДНК разрезают по сайтам для линеаризации. Двухнитевую кодирующую олигонуклеотид последовательность ДНК между сайтами рестрикции, включающую требуемые мутации (мутацию) синтезируют, используя стандартные процедуры, причем две нити олигонуклеотида синтезируют отдельно и затем гибридизируют вместе, используя стандартные методики. Двухнитевой олигонуклеотид называется кассетой. Такая кассета конструируется для получения концов 5' и 3', которые совместимы с концами линеаризованной плазмиды, таким образом, что могут быть прямо лигированы в плазмиду. В результате плазмиды содержит последовательность мутантной ДНК.

В другом варианте или дополнительно требуемая последовательность аминокислоты, кодирующая полипептидный вариант, может быть определена, а нуклеотидная последовательность, кодирующая такой вариант аминокислотной последовательности, может быть получена синтетически.

Аминокислотная последовательность исходного полипептида модифицируется для получения варианта области Fc с измененным связывающим средством или действием рецептора Fc *in vitro*, и/или *in vivo*, и/или измененным действием антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) *in vitro*, и/или *in vivo*, и/или с измененным действием клеточно опосредованной цитотоксичности (CDC) *in vitro* и/или *in vivo*.

Обычно модификация вызывает одно или несколько аминокислотных замещений. Замещение может быть, например, «консервативным замещением». Существенным модификации биологических свойств области Fc могут быть дополнены выбором замещений, которые существенно отличаются по их воздействию на поддержание (а) структуры каркаса полипептида в области замещения, например, в виде конформации плоскости или спирали, (б) заряда или гидрофобности молекулы по сайту-мишени, или (в) объема боковой цепи. Природные остатки поделены на группы, основанные на общих свойствах боковых цепей:

- (1) гидрофобные: мет, ал, вал, лей, иле,
- (2) нейтральные гидрофильные: цис, сер, тре,
- (3) кислотные: асп, глю,
- (4) основные: асп, глн, хис, лей, арг,
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: гли, про, и
- (6) ароматические: три, тир, фен.

Помимо аминокислотных замещений настоящее изобретение рассматривает другие модификации аминокислотной последовательности исходной области для получения, например, варианта области Fc с измененной эффекторной функцией.

Например, можно делегировать один или несколько аминокислотных остатков области Fc для снижения связывания с рецептором FcR. Обычно можно делегировать один или несколько остатков области Fc, идентифицированных в настоящем изобретении

в качестве влияющих на связывание FcR, для того, чтобы получить такой вариант области Fc. Обычно можно делегировать не более примерно 1-10 остатков в таком варианте осуществления настоящего изобретения. Область Fc в настоящем изобретении, включающая одну или несколько аминокислотных делеций, предпочтительно сохраняет по меньшей мере примерно 80%, предпочтительно по меньшей мере примерно 90%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 95%, исходной области Fc или нативной области последовательности Fc человека.

Путем внедрения модификаций соответствующей аминокислотной последовательности в исходную область Fc, например, можно получить вариант области Fc, который (а) опосредует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток человека более или менее эффективно, и/или (б) связывает рецептор Fc гамма (Fc.gamma.R) с большим или меньшим сродством по сравнению с исходным полипептидом. Такие варианты области Fc могут обычно включать по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в области Fc. Комбинирование аминокислотных модификаций предположительно особенно желательно. Например, вариант области Fc может включать две, три, четыре, пять и более замещений, например, в определенных положениях области Fc, выявленных в настоящем изобретении.

Например, в составе IgG1 может быть получен вариант области Fc с уменьшенным связыванием Fc.gamma.R за счет внедрения аминокислотной модификации по какому-нибудь одному или нескольким положениям аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 или 439 области Fc. См., например, US 6737056.

Варианты IgG1, которые проявляют пониженное связывание с Fc.gamma.RI, включают варианты, содержащие аминокислотную модификацию области Fc по какому-нибудь одному или нескольким положениям аминокислот 238, 265, 269, 270, 327 или 329. См., например, US 6737056.

К вариантам IgG1, которые проявляют пониженное связывание с Fc.gamma.RII, относятся варианты, содержащие аминокислотную модификацию области Fc по какому-нибудь одному или нескольким положениям аминокислот 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 или 439. См., например, US 6737056.

К вариантам IgG1, которые проявляют пониженное связывание с Fc.gamma.RIII, относятся варианты, содержащие аминокислотную модификацию области Fc по какому-нибудь одному или нескольким положениям аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 или 437. См., например, US 6737056.

Специалисту в данной области следует учитывать, что сходные эффекты могут быть получены путем варьирования остатков в других областях Ig Fc, хотя нумерация остатков может быть другой. См., например, US 6737056.

Может быть сконструирована область Fc с измененной эффекторной функцией, например, путем модифицирования связывания C1q и/или связывания FcR и за счет этого изменения действия CDC и/или действия ADCC. Например, можно получить вариант области Fc с улучшенным связыванием C1q и улучшенным связыванием Fc.gamma.RIII, например, имеющий и улучшенное действие ADCC, и улучшенное действие CDC. В другом варианте, если требуется, чтобы эффекторная функция была снижена или ликвидирована, может быть сконструирован вариант области Fc с пониженным

действием CDC, и/или пониженным действием ADCC. В других вариантах осуществления настоящего изобретения можно повысить только одно из указанных действий, а также необязательно понизить другие действия, например, получить вариант области Fc с улучшенным действием ADCC, но пониженным действием CDC, и наоборот. См., например, US 6737056.

Дальнейшие изменения аминокислотной последовательности могут заключаться в том, что остаток цистеина, который не участвует в поддержании должной конформации варианта полипептида, также может быть замещен, обычно на серин, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предупреждения неправильного поперечного сшивания. См., например, US 6737056.

Другой тип аминокислотного замещения призван изменять шаблон гликозилирования полипептида. Такое изменение может быть достигнуто делецией одной или нескольких углеводных частей, обнаруженных в полипептиде, и/или добавлением одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не содержатся в полипептиде.

Гликозилирование полипептидов обычно N-связанное или O-связанное. N-связанное относится к присоединению углеводной части молекулы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, в которых X обозначает какую-либо аминокислоту за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводной части молекулы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие одной из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает сайт потенциального гликозилирования. O-связанное Гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, в большинстве случаев к серину или треонину, хотя также может быть и к 5-гидроксипролину или 5-гидроксилизину. Добавление сайтов гликозилирования к полипептиду обычно сопровождается изменением аминокислотной последовательности, например, таким образом, что она содержит одну или несколько указанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть получено добавлением или замещением одного или нескольких остатков серина или треонина на последовательность исходного полипептида (для O-связанных сайтов гликозилирования). Пример варианта гликозилирования имеет аминокислотное замещение остатка Asn 297 в тяжелой цепи. См., например, US 6737056.

Кроме того, класс, подкласс или аллотип области Fc при желании может быть изменен замещением одной или нескольких аминокислот для получения области Fc с аминокислотной последовательностью, более гомологичной по отношению к другому классу, подклассу или аллотипу. Например, область Fc мыши может быть изменена для получения аминокислотной последовательности, которая более гомологична к области Fc человека; область Fc не-A аллотипа IgG1 человека может быть модифицирована для получения области Fc A аллотипа IgG1 человека, и т.д. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислотной модификации (модификацию) в контексте настоящего изобретения с измененным FcR связыванием и/или ADCC действием получают в домене CH2 области Fc, а домен CH3 делегируют или замещают другим доменом димеризации. Предпочтительно домен CH3 сохраняют (независимо от аминокислотных модификаций, которые изменяют эффекторную функцию, согласно описанию настоящего изобретения). См., например, US 6737056.

Исследование связывания

Способность варианта полипептида связывать рецептор FcR может быть повышена.

Если FcR является рецептором области Fc и обладает высоким сродством, например, Fc.gamma.RI, FcRn или Fc.gamma.RIIIA-V158, связывание может быть измерено путем титрования варианта мономерного полипептида и измерения связанного варианта полипептида, используя антитело, которое специфически связывает вариант полипептида в стандартном формате метода ELISA. См., например, US 6737056. Исследования связывания FcR для рецепторов FcR, обладающих низким сродством, известны в данной области и описаны, например, в US 6737056.

Для оценки действия ADCC варианта полипептида может быть проведен анализ ADCC *in vitro*, используя варьирующие соотношения эффектор:мишень. Применимыми «эффекторными клетками» для такого исследования могут быть моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В другом варианте, или дополнительно, действие варианта полипептида может быть оценено *in vivo*, например, в модели животного, например, описанной Clynes и др., PNAS (USA) 95, 1998, сс. 652-656.

Векторы экспрессии

Какой-либо соответствующий вектор экспрессии может применяться в практике настоящего изобретения. Например, специалист в данной области мог бы экспрессировать IgG1, например, в pSVgpt. Вектор экспрессии pSVgpt основан на pSV₂gpt (Mulligan и Berg, 1980) и включает ген устойчивости к ампициллину для отбора бактериальных клеток, ген gpt для отбора в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, геномную последовательность, кодирующую ген константной области, и SV40 поли-A последовательности. Варибельную область тяжелой цепи для экспрессии внедряют в виде фрагмента от сайта HindIII до сайта BamHI.

Вектор экспрессии pSVhyg включает ген устойчивости к ампициллину для отбора в бактериальных клетках, ген hyg для отбора в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи иммуноглобулина, геномную последовательность, кодирующую ген константной области каппа, и последовательности энхансера каппа и SV40 поли-A. Варибельная область легкой цепи для экспрессии инсертирована в виде фрагмента от сайта HindIII до сайта BamHI.

Правильность последовательности ДНК затем может быть подтверждена для векторов экспрессии для гуманизированных V_H и V_K.

Для получения антитела векторы экспрессии гуманизированной тяжелой и легкой цепи могут быть внедрены в соответствующие линии продуцирующих клеток, известных в данной области, например в клетки NS0. Внедрение векторов экспрессии может сопровождаться совместной трансфекцией через электропорацию или каким-либо другим соответствующим методом, известным в данной области. Линии клеток, вырабатывающих антитело, затем могут быть отобраны и размножены, а гуманизированное антитело очищено. Очищенные антитела затем могут быть проанализированы стандартными методами, например, SDS-PAGE.

Антитела с повышенным сродством, специфичностью, стабильностью

Последовательность CDRL2 («KVSNRFS») антитела мыши C2 может быть незначительно модифицирована без побочного воздействия на проявляемую активность антитела. Консервативные замещения могут быть получены через замену R на K в положении 50 и S на N в положении 53. Двумя другими последовательностями CDRL2 являются «RVSNRFS» и «KVSSRFS» соответственно. Они включены в последовательность V_K мыши без других изменений и обозначены C2 VK-R и C2 VK-S

соответственно.

Сродство, специфичность и стабильность антитела по настоящему изобретению, описанного выше, или его фрагмента, могут быть модифицированы путем изменения профиля гликозилирования или структуры, приводящих к повышенным терапевтическим показателям.

Для достижения такого изменения в структуре гликозилирования, клетки-хозяева могут быть сконструированы таким образом, что они способны экспрессировать предпочтительный диапазон активности гликопротеин-модифицированной гликозилтрансферазы, которая повышает разветвленные GlcNAc, несущие сложные N-связанные олигосахариды. Кроме того, могут быть получены модифицированные гликоформы гликопротеинов, например, антитела, в том числе целые молекулы антител, фрагменты антител или гибридные белки, которые включают область, эквивалентную области Fc иммуноглобулина, имеющую повышенную Fc-опосредованную клеточную цитотоксичность.

Способы получения антитела с модифицированным типом гликозилирования известны специалистам в данной области и описаны, например, в EP 1071700, US 2005272128, Ferrara и др., J Biol Chem 281(8), 2006, сс. 5032-5036, Ferrara и др., Biotechnology и Bioengineering 93(5), 2006, сс. 851-861.

Фармацевтическое приготовление и введение

Антитела по настоящему изобретению, но особенно моноклональное антитело по настоящему изобретению, может быть приготовлено в физиологически приемлемом составе и может включать фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или эксципиент, используя известные методики. Например, антитело по настоящему изобретению, описанное выше, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, в частности моноклональное антитело, включая какое-либо функционально эквивалентное антитело или его функциональные части, комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем, растворителем и/или эксципиентом для формирования терапевтической композиции. Соответствующие фармацевтические носители, растворители и/или эксципиенты известны в данной области и включают, например, фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, например, по типу масло/вода, различные типы увлажняющих агентов, стерильных растворов и т.д.

Состав композиции по настоящему изобретению может быть получен стандартным методом, известным специалистам в данной области.

Композиции по настоящему изобретению могут быть введены субъекту в твердой, жидкой или аэрозольной форме в соответствующей фармацевтически эффективной дозе. К примерам твердых композиций относятся таблетки, мази, имплантируемые дозированные единицы. Таблетки могут вводиться перорально. Терапевтические мази могут применяться местно. Имплантируемые дозированные единицы могут вводиться местно, например, в место опухоли, или могут имплантироваться для системного высвобождения терапевтической композиции, например, подкожно. Примерами жидкой композиции являются составы, адаптированные для инъекций внутримышечных, подкожных, внутривенных, внутриартериальных, и составы для местного и внутриглазного введения. Примерами аэрозольных составов являются ингаляционные составы для введения в легкие.

Композиции могут вводиться стандартными способами введения. Обычно композиция может вводиться местно, перорально, ректально, внутриназально, внутрикожно, внутривенно или парентерально (например, внутривенно, подкожно или

внутримышечно). Кроме того, композиция может быть включена в матрицу устойчивого высвобождения, например биоразрушаемые полимеры, полимеры, имплантированные вблизи от целевого места высвобождения, например в месте опухоли. Способ включает введение единичной дозы, введение повторяющихся доз с заранее установленными интервалами и устойчивое введение на протяжении заранее определенного периода времени.

Матрицей устойчивого высвобождения, используемой в настоящем изобретении, может быть матрица из материалов, обычно полимерных, поддающихся разрушению ферментами, или кислотным/щелочным гидролизом, или растворением. После внедрения в организм матрица подвергается воздействию ферментов и тканевых жидкостей. Матрицу устойчивого высвобождения желательно выбирать по биосовместимости материалов, например, липосом, полилактоидов (полимолочной кислоты), полигликолидов (полимера из гликолевой кислоты), сополимера полилактида и гликолида (сополимера молочной и гликолевой кислот), полиангидридов, поли(орто)эфиров, полипептидов, гиалуроновой кислоты, коллагена, хондроитина сульфата, полиаминокислот, жирных кислот, фосфолипидов, полисахаридов, нуклеиновых кислот, полиаминокислот, аминокислот, например, фенилаланина, тирозина, изолейцина, полинуклеотидов, поливинилпропилен, поливинилпирролидона и силикона.

Предпочтительной биоразрушаемой матрицей является матрица одного из материалов: полилактида, полигликолида или сополимера полилактида и гликолида (сополимера молочной и гликолевой кислот).

Специалистам в соответствующей области известно, что доза композиции может зависеть от разных факторов, например подвергаемого лечению состояния, определенной используемой композиции и других клинических факторов, например, массы тела, размера, пола и общего состояния пациента, площади поверхности тела, определенного вводимого соединения или композиции, других одновременно вводимых лекарственных средств, а также от способа введения.

Композиция может вводиться в комбинации с другими композициями, включающими биологически активное соединение, особенно по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений против окислительного стресса, антиапоптозных соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, например, пирензепина и метаболитов, 3-амино-1-пропансульфоновой кислоты, 1,3-пропандисульфоната, активаторов α -секретазы, ингибиторов β - и γ -секретазы, тау белков, нейротрансмиттеров, нарушителей β -слоев, аттрактантов для амилоид бета очищающих/истоющих клеточных компонентов, ингибиторов усеченного по N-концу амилоида бета, включая амилоид бета 3-42 в форме пироглутамата, противовоспалительных молекул или ингибиторов холинэстеразы (cholinesterase inhibitor - ChEI), например, такрина, ривастигмина, донепезила и/или галантамина, агонистов M1 и других лекарственных средств, включая какой-либо амилоид или тау модифицированное лекарственное средство и пищевые добавки, пищевые добавки вместе с антителом по настоящему изобретению, а также необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или эксципиент и продуценты для лечения заболеваний.

Белковые фармацевтического действия материалы могут быть представлены в количестве от 1 нг до 10 мг на дозу. Обычно режим введения находится в диапазоне от 0,1 мкг до 10 мг антитела по настоящему изобретению, особенно в диапазоне от 1,0 мкг до 1,0 мг, и более предпочтительно в диапазоне от 1,0 мкг до 100 мкг, с индивидуальными количествами, попадающими в эти диапазоны, что также составляет

часть настоящего изобретения. Если введение проводят путем непрерывной инфузии, уточненная доза может быть в диапазоне от 0,01 мкг до 10 мг на кг массы тела в час, с индивидуальными количествами, попадающими в эти диапазоны, что также составляет часть настоящего изобретения.

5 Введение обычно парентеральное, например внутривенное. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные и неводные растворы, суспензии и эмульсии. К неводным растворителям относятся, но ими не ограничиваются, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, инъекционные органические сложные эфиры, например этилолеат. Водные растворы могут быть выбраны из группы,
10 состоящей из воды, водноспиртовых растворов, эмульсий или суспензий, включая солевые и буферные среды. К парентеральным растворителям относятся раствор хлорида натрия, раствор Рингера декстрозный, раствор декстрозы и хлорида натрия, раствор Рингера лактат или нелетучие масла. К внутривенным растворителям относятся жидкие и пищевые наполнители, электролитные наполнители (например, основанные
15 на растворе Рингера декстрозном) и другие. Также могут содержаться консерванты, например, антимикробные, антиоксидантные, хелатирующие агенты, инертные газы и др.

Фармацевтическая композиция может дополнительно включать носители, например, сывороточный альбумин или иммуноглобулин, особенно от человека. Другими агентами
20 биологического действия могут быть в фармацевтических композициях настоящего изобретения в зависимости от их предназначения.

Если связываемая мишень расположена в мозге, предусмотрены некоторые варианты осуществления настоящего изобретения для проникновения антитела или его действующего фрагмента через гематоэнцефалический барьер. Некоторые
25 нейродегенеративные заболевания связаны с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, поэтому антитело или его действующий фрагмент легко проникают в мозг. Если гематоэнцефалический барьер сохраняется интактным, могут быть применены некоторые известные подходы для транспортировки молекул через него, включая, но ими не ограничиваясь, физические методы, методы, основанные
30 на липидах, и методы, основанные на рецепторе и канале.

К физическим методам транспортировки антитела или его действующего фрагмента через гематоэнцефалический барьер относятся, но ими не ограничиваются, обход гематоэнцефалического барьера или создание отверстий в гематоэнцефалитном барьере. К обходным методам относятся, но ими не ограничиваются, прямая инъекция в мозг
35 (см., например, Papanastassiou и др., Gene Therapy 9, 2002, сс. 398-406) и имплантация высвобождающего устройства в мозг (см., например, Gill и др., Nature Med. 9, 2003, сс. 589-595, и Gliadel Wafers™, фирма Guildford Фармацевтическая). К средствам преодоления барьера относятся, но ими не ограничиваются, ультразвук (см., например, US 2002/0038086), осмотическое давление (например, введением гипертонического раствора маннита (кн.: Neuwelt E. A. «Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation»,
40 1989, изд-во Plenum Press, т.1-2, Нью-Йорк), проницаемость за счет применения, например, брадикинина или агента проницаемости А-7 (см., например, US 5112596, 5268164, 5506206 и 5686416), и трансфекция нейронов, которые преодолевают гематоэнцефалитный барьер с помощью векторов, содержащих гены, кодирующие
45 антитело или антигенсвязывающий фрагмент (см., например, US 2003/0083299).

Методы на основе липидов по доставке антитела или его действующего фрагмента через гематоэнцефалический барьер включают, но ими не ограничиваются, инкапсулирование антитела или его действующего фрагмента в липосомы, которые

соединяются с антитело-несущими фрагментами, связывающимися с рецепторами на эндотелии сосудов гематоэнцефалического барьера (см., например, US 20020025313), и наносят антитело или его действующий фрагмент на частицы липопротеина низкой плотности (см., например, US 20040204354) или на аполипопротеин Е (см., например, US 20040131692).

Способы, основанные на рецепторе и канале, по транспортировке антитела или его действующего фрагмента через гематоэнцефалический барьер, включают, но ими не ограничиваются, применение глюкокортикоидных блокаторов для повышения проницаемости через гематоэнцефалический барьер (см., например, US 2002/0065259, 2003/0162695 и 2005/0124533), активации калиевых каналов (см., например, US 2005/0089473), подавления переносчиков АВС лекарственного средства (см., например, US 2003/0073713), нанесения антитела с трансферрином и модулирования действия одного или нескольких рецепторов трансферина (см., например, US 2003/0129186) и катионизирования антитела (см., например, US 5004697).

Выявление/диагностика

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы и наборы для выявления и диагностики связанных с амилоидом заболеваний и состояний. К этим способам относятся известные иммунологические способы, обычно используемые для выявления или подсчета веществ в биологических образцах или в состоянии *in situ*.

Диагноз связанного с амилоидом состояния или заболевания пациента может быть поставлен путем выявления иммуноспецифического связывания моноклонального антитела или его действующего фрагмента с эпитопом амилоидного белка в образце или *in situ*, которое включает получение образца, или определенной части тела, или определенной области тела, предположительно содержащих амилоидный белок, и приведение его в контакт с антителом, которое связывает эпитоп на амилоидном белке, позволяя антителу связать амилоидный белок с формированием иммунологического комплекса, выявляя формирование иммунологического комплекса и корреляцию наличия или отсутствия иммунологического комплекса с наличием или отсутствием амилоидного белка в образце, или определенной части тела, или определенной области тела.

Биологическими образцами, которые могут применяться для диагностики связанного с амилоидом заболевания или состояния, например, могут быть жидкости, например сыворотка, плазма, слюна, секреты пищеварительной системы, слезь, спинномозговая жидкость, лимфатическая жидкость и др., или образцы тканей или клеток, полученные от организма, например образцы нервной ткани, образцы мозга, сердца или ткани сосудов. Для определения наличия или отсутствия амилоидного белка в образце могут быть применены какие-либо из методов, известных специалистам в данной области. (См. Harlow и Lane в кн.: «Antibodies: A Laboratory Manual», 1988, изд. Cold Spring Harbor Laboratory, Нью-Йорк, сс. 555-612). Могут быть, например, использованы анализы, которые используют методы непрямого определения, используя вторичные реагенты для выявления, методы ELISA и методы анализа иммунопреципитации и агглютинации. Подробное описание этих методов, например, приведено в WO96/13590 и WO96/29605.

Для диагностики *in situ* антитело или какая-либо его действующая и функциональная часть могут быть введены в диагностируемый организм методами, известными в данной области, например, инъекцией внутривенно, интраназально, внутрибрюшинно, интрацеребрально, внутриартериально таким образом, что может быть осуществлено специфическое связывание между антителом по настоящему изобретению с областью эпитопа на амилоидном белке. Комплекс антитело/антиген может быть обнаружен по

метке, присоединенной к антителу или его функциональному фрагменту.

Иммуноисследования, используемые для диагностики, обычно основаны на меченых антигенах, антителах или вторичных реагентах. Эти белки или реагенты могут быть помечены соединениями, обычно известными специалистам в данной области, к которым относятся ферменты, радиоизотопы, а также флуоресцентные, люминесцентные и хромогенные вещества, включая окрашенные частицы, например, коллоидное золото и латексные гранулы. Из них может применяться радиоактивная метка для почти всех типов исследования с большим числом вариаций. Конъюгированные с ферментом метки особенно применимы, если требуется избежать радиоактивности или если нужны быстрые результаты. Флуорохромы, хотя необходимо дорогое оборудование для их применения, предоставляют очень чувствительный метод детекции. Антитела, применимые в этих исследованиях, включают моноклональные антитела, поликлональные антитела и очищенные по сродству поликлональные антитела.

В другом варианте на антитело может быть нанесена метка непрямой реакцией с мечеными веществами, которые имеют сродство к иммуноглобулину, например, белком А или G или вторые антитела. Антитело может быть объединено со вторым веществом и выявлено меченым третьим веществом, имеющим сродство со вторым веществом, объединенным с антителом. Например, антитело может быть объединено с биотином, и конъюгат антитело-биотин выявляют, используя меченый авидин или стрептавидин. Сходным образом антитело может быть объединено с гаптенем, и конъюгат антитело-гаптен выявляют, используя меченое анти-гаптенное антитело.

Специалистам в данной области могут быть известны эти и другие соответствующие метки, которые могут быть применены в соответствии с настоящим изобретением. Связывание таких меток с антителами или их фрагментами могут быть произведены, используя стандартные методы, известные специалистам в данной области. Типичные методики описаны Kennedy J. H. и др., (Clin. Chim. Acta 70, 1976, сс. 1-31), Schurs A. H. W. M. и др. (Clin. Chim Acta 81, 1977, сс. 1-40). Методами соединения, упоминаемыми позднее, являются метод с применением глутаральдегида, метод с применением периодата, метод с применением дималеимида и другие, каждый из которых включен в настоящее изобретение в виде ссылки.

В современном иммуноанализе используют двойное антитело для выявления наличия определяемого соединения. Антитело метят косвенным образом путем взаимодействия со вторым антителом, которое помечают выявляемой меткой. Второе антитело предпочтительно является антителом, которое связывается с антителами животного, от которого получено моноклональное антитело. Иначе говоря, если моноклональное антитело является мышинным антителом, тогда меченое второе антитело является антителом против мышинного антитела. Для моноклонального антитела, используемого в описанном ниже анализе, такая метка предпочтительно является покрытой антителом гранулой, особенно магнитной гранулой. Для поликлонального антитела, используемого в иммуноанализе, описанном в настоящем изобретении, метка предпочтительно является выявляемой молекулой, например, радиоактивной, флуоресцентной или электрохемилюминесцентным веществом.

Другие системы двух антител являются системой быстрого формата, поскольку они адаптированы для быстрого определения наличия исследуемого соединения, и также могут использоваться в рамках охвата настоящего изобретения. Эта система требует высокого сродства между антителом и исследуемым соединением. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения наличие амилоидного белка определяют, используя пару антител, каждое из которых специфично для амилоидного белка. Одно

антитело из указанной пары обозначается в контексте настоящего изобретения «антителом-детектором», а другое антитело из указанной пары называется «антителом-ловушкой». Моноклональное антитело по настоящему изобретению может применяться в качестве или антитела-ловушки, или антитела-детектора. Моноклональное антитело по настоящему изобретению также может использоваться в качестве и антитела-ловушки, и антитела-детектора вместе в одном анализе. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения таким образом используют метод сэндвича с двойным антителом для выявления амилоидного белка в образце биологической жидкости. В этом методе исследуемое соединение (амилоидный белок) зажимается между антителом-детектором и антителом-ловушкой, причем антитело-ловушка необратимо иммобилизовано на твердой основе. Антитело-детектор может содержать выявляемую метку для идентификации наличия сэндвича антитело-исследуемое соединение и, таким образом, наличие исследуемого соединения.

К примерам твердофазных веществ относятся, но ими не ограничиваются, планшеты для микротитрований, тест-пробирки из полистерола, магнитные, пластиковые или стеклянные гранулы и пластины, которые известны в области иммуноанализа и ферментного иммуноанализа. Методы соединения антитела с твердыми фазами известны специалистам в данной области. Ранее ряд пористых материалов, например, нейлона, нитроцеллюлозы, ацетата целлюлозы, стеклянных волокон и других пористых материалов, был использован в качестве твердой основы.

Настоящее изобретение также относится к диагностическому набору для выявления амилоидного белка в биологическом образце, включающем композицию, согласно описанному выше. Кроме того, настоящее изобретение относится к последнему диагностическому набору, который помимо композиции, описанной выше, также включает реагент для выявления, согласно описанному выше. Понятие «диагностический набор» относится в основном к какому-либо диагностическому набору, известному в данной области. Более конкретно, последний термин относится к диагностическому набору согласно описанию Zrein и др. (1998).

Еще один объект настоящего изобретения предусматривает новые иммунозонды и наборы для тестирования и диагностики связанных с амилоидом заболеваний и состояний, включая антитела по настоящему изобретению. Для иммунозондов антитела прямо или опосредованно присоединены к соответствующей репортерной молекуле, например, к ферменту или радионуклиду. Тест-набор включает контейнер, несущий одно или несколько антител по настоящему изобретению, и инструкции по применению антител для цели связывания с амилоидным белком для формирования иммунологического комплекса и выявления формирования иммунологического комплекса таким образом, что наличие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с наличием или отсутствием амилоидного белка.

Примеры

Материалы

Разработка и приготовление мышинового моноклонального антитела ACI-01-Ab7C2 (называемого в настоящем изобретении «mC2» и «hC2» для гуманизированного антитела C2) описаны в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке EP 05 02 7092.5, сущность которой включена в контекст настоящего изобретения в виде ссылки.

Клетки гибридомы FP-12H3-C2, вырабатывающие мышиноое моноклональное антитело ACI-01-Ab7C2 (называемое в настоящем изобретении «C2» и «hC2» для гуманизированного C2 антитела), были депонированы 01 декабря 2005 в связи с находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявкой EP05027092.5 в

коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) по адресу: Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, под номером DSM ACC2750.

- 5 Клетки гибридомы культивируют в среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle Medium - DMEM), обогащенной 10% фетальной сывороткой теленка и антибиотиками (пенициллином/стрептомицином). Изотип получаемого антитела проверяют и подтверждают ожидаемую принадлежность к мышинному IgG2b/каппа.

Анализ

- 10 Метод ELISA для определения связывания амилоида бета обеспечивает надежное измерение эффективности антитела C2. Положительным контролем антитела является мышинное антитело FP-12H3-C2 (фирма Genovac, номер в каталоге AK379/01) и стандартное антитело 1560 фирмы Chemicon (номер в каталоге 0508008791).

Выбор константных областей человека

- 15 Поскольку для клинического антитела-кандидата восстановление иммунной системы не является желательным, выбранной константной областью человека для тяжелой цепи является IgG4 человека, модифицированный для замены серина в положении 228 в шарнирной области на пролин (HuIgG4 Ser-Pro). Эта мутация стабилизирует межцепочечную дисульфидную связь и предупреждает формирование половинных молекул, которые могут быть в препаратах нативного IgG4 человека. Антитело, экспрессируемое вырабатываемыми клеточными линиями может также иметь удаленный
- 20 концевой лизин. Последовательности константных областей человека HuIgG4 Ser-Pro и каппа человека представлены в виде SEQ ID NO:17 и 14, соответственно.

Пример 1. Клонирование и сиквенс переменных областей антитела

- 25 Суммарную РНК получают из 3×10^6 клеток гибридом (одна колба T175), используя мини-набор Qiagen RNeasy (номер в каталоге 74104). РНК элюируют в 50 мкл воды и контролируют в 1,2% агарозном геле. Кондиционированную среду от клеток сохраняют, и образцы используют для тестирования в анализе действия антитела.

- 30 V_H и V_K кДНК получают, используя обратную транскриптазу с праймерами мышинного IgG и к константной области. Первую цепь кДНК амплифицируют методом ПЦП, используя большой набор праймеров сигнальных последовательностей. Амплифицированные ДНК очищают в геле и клонируют в векторе pGem® T Easy (фирма Promega). Полученные клоны V_H и V_K подвергают скринингу на инсерты ожидаемого
- 35 размера методом ПЦР и последовательность ДНК выбранных клонов определяют автоматическим секвенированием ДНК. Расположения областей, определяющих комплементарность, (complementarity determining regions - CDR) в последовательностях определяют относительно последовательностей других антител (Kabat EA и др., 1991). В настоящей заявке используют нумерацию Kabat для переменных областей антитела, следовательно, номера остатков могут отличаться от прямой линейной нумерации.
- 40

- Последовательность ДНК и логически установленная аминокислотная последовательность mC2 V_K представлены в виде SEQ ID NO:29 и 27, соответственно. Четыре клон вырабатывают указанную идентичную продуктивную последовательность. Непродуктивную отклоняющуюся последовательность V_K , которая
- 45 образуется от партнера гибридомы по слиянию, также обнаруживают у ряда клонов.

Для mC2 V_H , выделяют две разные продуктивные последовательности.

Последовательность mC2 V_H AF (см. SEQ ID NO:30) обнаруживают в общей сложности у 29 клонов, с 14 заменами единичных оснований в отдельных клонах.

Последовательность mC2 V_H В обнаруживают в общей сложности у 8 клонов. Пять из них представляют последовательность большинства, последовательности трех других клонов представляют ее вариации. Возможно, что эти сходные последовательности V_H В возникают в качестве артефакта ПЦР амплификации. Непродуктивную нарушенную последовательность V_H также получают из гибридомы С2 и приписывают дефектному сочленению V-D-J.

Для того чтобы определить правильную действующую последовательность mC2 V_H, получают два химерных антитела с двумя разными последовательностями V_H, AF и В, комбинируемыми с mC2 V_K, проверяемых на правильное действие антитела.

Пример 2. Конструирование генов химерного антитела

Химерное антитело человека в наиболее общей форме состоит из константных областей человека, связанных в мышины (или другими, но не принадлежащими человеку) переменными областями. Химерное антитело предоставляет весьма полезный инструмент, во-первых, для подтверждения, что были идентифицированы корректные переменные области, во-вторых для применения в качестве контрольного антитела в антиген-связывающих исследованиях с теми же эффекторными функциями, используя те же реагенты вторичного обнаружения, что и гуманизированное или сконструированное антитело, и также могут применяться для исследования фармакокинетики и других свойств константных областей человека относительно определенной мишени для антитела.

Векторы экспрессии химерной тяжелой цепи конструируют, совмещая mC2 V_H AF или mC2 V_H В переменные области, связанные с константной областью HuIgG4 (Ser-Pro) в векторе экспрессии pSVgpt (фиг.1). Основой является pSV₂gpt (Mulligan и Berg, 1980), которая включает ген устойчивости к ампициллину для отбора в бактериальных клетках, ген gpt для отбора в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, геномную последовательность, кодирующую ген константной области и SV40 поли-А последовательности. Переменную область тяжелой цепи для экспрессии инсертируют в качестве фрагмента HindIII - BamHI.

Вектор химерной легкой цепи конструируют, совмещая С2 V_K, связанный с константной областью С каппа человека в векторе экспрессии pSVhyg (фиг.2). pSVhyg включает ген устойчивости к ампициллину для отбора в бактериальных клетках, ген hyg для отбора в клетках млекопитающих, энхансерную область тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, геномную последовательность, кодирующую ген константной области каппа и включающую энхансер каппа и SV40 поли-А последовательности. Переменная область легкой цепи для экспрессии инсертируют в виде фрагмента HindIII - BamHI.

Кассеты экспрессии для последовательностей мыши С2 V_H и V_K конструируют путем добавления 5' фланкирующей последовательности, включающей лидерный сигнальный пептид, лидерный интрон и промотор иммуноглобулина мыши, а также 3' фланкирующей последовательности, включающей сайт сплайсирования и интронную последовательность, используя векторы V_H-PCR1 и V_K-PCR1 в качестве матриц (Riechmann и др., 1988). Корректность последовательности ДНК подтверждают для V_H и V_K в химерных векторах экспрессии. Последовательности ДНК и аминокислот V_H и V_K генов в кассетах экспрессии показаны на фиг.3 и 4.

Пример 3. Экспрессия химерного антитела

3.1 Экспрессия в стабильных линиях клеток

Для экспрессии антитела используют линию клеток NS0 миеломы мыши, не продуцирующих иммуноглобулин, полученную из Европейской коллекции культур клеток животных, Нортон, Великобритания (European Collection of Animal Cell Cultures - ECACC, номер в каталоге 85110503). Векторы экспрессии тяжелой и легкой цепи совместно трансфецируют в клетки NS0 путем электропорации. Колонии, экспрессирующие ген gpt, отбирают в среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM), обогащенной 10% фетальной сыворотки телят (ФСТ), 0,8 мкг/мл микофеноловой кислоты и 250 мкг/мл ксантина. Проводят скрининг трансфецированных клонов на выработку антитела человека методом ELISA на IgG человека. Линии клеток, секретирующих антитело, нарабатывают, и наиболее продуктивные клоны отбирают и замораживают в жидком азоте. Наиболее продуктивные линии клеток для каждого антитела нарабатывают в среде, согласно указанному выше, но только с 5% ФСТ. Химерное антитело очищают, используя Prosep®-A (фирма Bioprocessing Ltd). Концентрацию определяют методом ELISA для IgGк антитела человека. Антитела также анализируют методом SDS-PAGE.

3.2. Кратковременная экспрессия химерного антитела

Для ускорения тестирования разных химерных антител используют кратковременную экспрессию для быстрой выработки малых количеств супернатантов клеток, содержащих рекомбинантное антитело для тестирования. Кассеты экспрессии mC2 V_H и V_K переносят на векторы, основанные на pcDNA3.1 (фирма Invitrogen) для кратковременной экспрессии. Вектор тяжелой цепи включает константную область IgG человека. Вектор легкой цепи включает константную область каппа человека. И mC2 V_H AF, и mC2 V_H B трансфецируют с mC2 V_K в эмбриональные клетки почки человека (HEK 298) с реагентом Lipofectamine 2000 (фирма Invitrogen, номер в каталоге 11668) по протоколу производителя. Кондиционированную среду от клеток собирают через 3 суток после трансфекции. Количество вырабатываемого антитела определяют методом ELISA для IgGк антитела человека.

Пример 4. Действие химерных C2 антител

4.1. Действие химерного C2 антитела, вырабатываемого путем кратковременной трансфекции

Образцы кондиционированной среды после кратковременной трансфекции тестируют на два разных химерных антитела методом ELISA по связыванию амилоида бета. Результаты четко показывают, что C2 V_H AF является корректной последовательностью. Химерное антитело C2 V_H AF/C2 V_K связывается хорошо в данном анализе, но C2 V_H B/C2 V_K не проявляет какого-либо связывания. Контрольное антитело Мыши Chemicon 1560 показывает хорошее связывание, но связывание поставленным очищенным мышинным антителом C2 было низким. Следует отметить, что другое вторичное антитело применяют для мышинных антител с мышинными константными областями по сравнению с химерными антителами с константными областями человека, поэтому результаты непосредственно нельзя сопоставить. Позднее было установлено, что кондиционированная среда от гибридомы C2 в настоящем анализе показывает хороший результат.

4.2. Действие очищенных химерных C2 антител

Два разных C2 химерных антитела очищают от стабильной линии клеток NS0 согласно описанию и тестированию методом амилоид бета ELISA. Полученные результаты находятся в соответствии с результатами, полученными с кратковременно экспрессированным антителом. Антитело C2 ChV_H AF/ChV_K связывается хорошо в

методе ELISA, а антитело C2 ChVH B/ChVK не связывается совсем.

Пример 5. Конструкция генов гуманизированного C2 антитела

Аминокислотные последовательности mC2 V_H и V_K сравнивают с

последовательностями антителом V_H и V_K антитела грызуна по базам данных NCBI и Kabat.

5.1. Вариабельная область легкой цепи

Наиболее близким геном зародышевой линии мыши к mC2 V_K является ген bb1, локус MMU231201, (Schable и др., 1999). Только две аминокислоты отличаются от указанной последовательности зародышевой линии, которые обе расположены в CDRL1. Установлены зрелые антитела мыши с близкой, но не идентичной последовательностью. Некоторые идентичны CDRL2 и идентичны CDRL3, но последовательность CDRL1 в антителе mC2 представляется уникальной. mC2 V_K может быть по классификации Kabat отнесена к подгруппе MuV_KII. Положение 87 в mC2 V_K скорее означает F, чем Y, что более свойственно в данной подгруппе, показывая, что этот остаток каркасного участка может быть важен для действия антитела. Сравнение с последовательностями V_K зародышевой линии человека показывает, что гены из подгруппы V_KII наилучшим образом совпадают с mC2 V_K (Сох и др., 1994). Последовательность DPK15 вместе с областью J region HuJ_K1 человека выбирают для обеспечения акцепторной последовательности каркасного участка для гуманизированной последовательности V_K.

Конструируют четыре гуманизированные последовательности V_K. C2HuVK1 состоит из mC2 V_K областей CDR с каркасными участками от DPK 15 и J_K1 человека. В версиях 2, 3 и 4 остатки мыши замещены в каркасном участке по положениям 45, или 87, или по обоим. Остаток 45 может быть вовлечен в поддержку конформации областей CDR. Остаток 87 локализован на границе раздела доменов V_H и V_K. Следовательно, эти остатки могут быть критическими для поддержания связывания антитела.

Положения и изменения, которые были произведены в областях каркасных участков легкой цепи, представлены в табл.1. Сравнение гуманизированных последовательностей с последовательностью mC2 V_K, а также с DPK15 и J_K1 человека.

5.2. Вариабельная область тяжелой цепи

Наиболее близким геном зародышевой линии мыши к mC2 V_H AF является ген VH7183, локус AF120466, (Langdon и др., 2000). Сравнение показано на фиг.5. Девять аминокислот отличаются от этой последовательности зародышевой линии, большинство расположено в CDR2. Обнаружены зрелые антитела мыши с идентичной или близкой (отличие в одном остатке) областью CDR1 или с близкой областью CDR2 (отличие в одном остатке), но не обнаружено ни одного со всеми тремя CDR, идентичными mC2 V_H AF. Область CDR3 антитела mC2 необычно короткая, состоящая только из трех остатков. Однако другие антитела обнаружены в базе данных с CDR3 данной длины. Последовательность mC2 V_H AF может быть отнесена по системе Kabat к подгруппе MuV_HIID. Остаток Residue 47 в mC2 V_H означает скорее L, чем более распространенный W, а остаток 94 означает скорее S, чем в норме R, свидетельствуя, что такие остатки в каркасном участке могут быть важны для действия антитела. Сравнение с последовательностями V_H зародышевой линии человека показывает, что гены из подгруппы V_HIII наилучшим образом сочетаются с mC2 V_H. Последовательность DP54

вместе с областью J человека HuJ_H6 отбирают для обеспечения акцепторных последовательностей каркасного участка для гуманизированной V_H .

Конструируют четыре гуманизированные последовательности V_H . C2HuVN1 состоит из областей CDR mC2 V_H AF с каркасными участками их DP54 и HuJ_H6 . В версиях 2, 3 и 4 мышиные остатки были замещены в каркасном участке по положениям 47 или 94, или по обоим. Остаток 47 в каркасном участке 2 создает контакт и с областями CDR, и с доменом V_K . Остаток 94 может участвовать в поддержке конформации областей CDR. Следовательно, эти остатки могут быть критическими для поддержания связывания антитела.

Положения и изменения, произведенные в областях каркасного участка тяжелой цепи, показаны в табл.2.

Пример 6. Конструкция генов гуманизированного антитела

Модифицированные вариабельные области конструируют методом перекрывающейся ПЦР рекомбинации. Кассеты экспрессии для химерного антитела, C2 Ch V_H AF и C2 Ch V_K , используют в качестве матриц для мутагенеза областей каркасного участка для требуемых последовательностей. Наборы пар мутагенных праймеров синтезируют, охватывают области, подвергаемые изменению. Полученные кассеты экспрессии гуманизированных V_H и V_K клонируют в pUC19 и подтверждают, что целая последовательность ДНК корректна и для V_H , и для V_K . Модифицированные гены V-области тяжелой и легкой цепи удаляют из pUC19 в виде кассет экспрессии HindIII - BamHI. Их трансформируют на векторы экспрессии pSVgpt и pSVhyg, которые включают Ser-pro или к константные области IgG4 человека, соответственно, как и для векторов химерного антитела. Подтверждают, что последовательность ДНК корректна для гуманизированных V_H и V_K в векторах экспрессии.

Пример 7. Экспрессия гуманизированных антител

7.1. Экспрессия в стабильных клеточных линиях

Векторы экспрессии гуманизированных тяжелой и легкой цепей совместно трансфецируют в клетки NS0 путем электропорации для экспрессии химерного антитела. Линии клеток, вырабатывающие антитело, отбирают и размножают, гуманизированные антитела очищают, точно так же, как химерное антитело. Очищенные антитела анализируют методом SDS-PAGE.

7.2. Краткосрочная экспрессия гуманизированных антител

Для ускорения тестирования разных гуманизированных конструкций V_H и V_K экспрессирующие кассеты гуманизированных V_H и V_K антитела C2 также переносят на векторы для краткосрочной экспрессии, описанной в разделе 7.2. Четыре конструкции V_K гуманизированного антитела C2 совместно трансфецируют с конструкцией V_H химерного антитела C2 в клетки HEK293. Подобным образом четыре конструкции V_H гуманизированного антитела C2 совместно трансфецируют с конструкцией V_K химерного антитела C2 в клетки HEK293. Кондиционированную среду от клеток собирают через трое суток после трансфекции. Количество вырабатываемого антитела определяют методом ELISA для антитела IgGK человека.

Пример 8. Действие гуманизированных антител C2

8.1. Действие гуманизированного антитела C2, выработанного путем краткосрочной трансфекции

Образцы кондиционированной среды при краткосрочной трансфекции тестируют

методом амилоид-бета ELISA. Полученные результаты четко показывают, что конструкции гуманизированной VH C2 HuVH AF версий 2 и 4 являются функциональными при комбинации с каппа цепью химерного антитела C2, и сопоставимы с химерным C2 антителом в настоящем исследовании. Напротив, у антител, содержащих C2 HuVH AF версии 1 и 3, объединенные с каппа цепью химерного антитела C2, в данном анализе показано, что связывание полностью отсутствует. Это означает, что замещение остатка мыши по положению 94 важно для действия антитела. Антитела, содержащие тяжелую цепь химерного антитела C2, комбинированные с четырьмя каппа цепями гуманизированного антитела C2, все показывают хорошее связывание, сопоставимое со связыванием химерного антитела при использовании метода ELISA.

8.2. Действие очищенного гуманизированного антитела C2

Восемь разных гуманизированных C2 антител, включающих все комбинации двух гуманизированных тяжелых цепей и четырех гуманизированных легких цепей, очищают от стабильной линии клеток NSO согласно описанному, и тестируют, используя метод амилоид-бета ELISA (фиг.6).

Полученные результаты четко указывают, что C2 HuVH4 антитела действуют лучше в анализе, чем C2 HuVH2 антитела. Из C2 HuVH2 антител, C2 HuVH2/HuVK3 показывает наилучшее связывание, но оно примерно в 2 раза ниже по сравнению с химерным контрольным антителом C2 ChVHAF/ChVK. Действие C2 HuVH2/HuVK2 в четыре-пять раз ниже по сравнению с контролем. Действие антител, включающих C2HuVH4 с четырьмя разными гуманизированными легкими цепями, сходно. Наибольшее действие устанавливают у C2HuVH4/HuVK1, и все четыре антитела близки к контрольному химерному антителу в данном анализе.

Пример 9. Модификации области CDRL2

9.1. Конструирование легкой цепи с модифицированной областью CDR 2

Выше указано, что многие антитела имеют ту же последовательность CDRL2 ("KVSNRFS"), что и антитело C2. Было решено исследовать, может ли область CDRL2 быть немного модифицирована без неблагоприятного воздействия на действие антитела. Были выбраны две консервативные замены: R для K в положении 50 и S для N в положении 53. Две разные последовательности CDRL2 следовательно представляют «RVSNRFS» и «KVSSRFS». Они были включены в последовательность V_K мыши без других изменений в виде mC2 VK-R и mC2 VK-S, соответственно.

9.2. Краткосрочная экспрессия модифицированного антитела CDRL2

Две конструкции легкой цепи антитела C2 с модифицированной областью CDRL2, описанной в разделе 11.2.1, клонируют в вектор легкой цепи для кратковременной экспрессии. Каждую конструкцию совместно трансфецируют с вектором V_H химерного антитела C2 в клетки HEK293. Кондиционированную среду от клеток собирают через трое суток после трансфекции. Количество вырабатываемого антитела определяют методом ELISA для IgGк антитела человека.

9.3 Действие антитела C2 с модифицированной областью CDRL2

Образцы кондиционированной среды при краткосрочной трансфекции mC2 V_K с модифицированной областью CDRL2, комбинированной с V_H антитела mC2, тестируют методом амилоид-бета ELISA (фиг.7). Оба, и VK-R, и VK-S антитела, сравнимы с химерным антителом C2, указывая, что индивидуальные выбранные модификации CDRL2 существенно не влияют на действие антитела в этом анализе.

Пример 10. Определение сродства

Для оценки связывающей специфичности и сродства мышинового (ACI-01-Ab-7-C2)

химерного (AF) и гуманизированного антитела (H4K1, H4K4), проводят анализ BIACORE.RTM., используя амилоид-бета 1-42 мономеры и волокна в качестве антигена, иммобилизованного на чипе CM5. Технология BIACORE.RTM. использует изменения в показателе преломления на поверхностном слое при связывании антитела с антигеном, иммобилизованным на слое. Связывание определяют с помощью поверхностного плазменного резонанса (surface plasmon resonance - SPR) света лазера, отраженного от поверхности. Анализ кинетики падающего и отраженного сигнала позволяет различать неспецифическое и специфическое взаимодействие. Применяют концентрацию антитела в диапазоне от 0,05 мкМ до 1,0 мкМ.

	Мономеры			Волокна		
	k_a (1/мсек)	k_d (1/сек)	KD(М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/сек)	KD(М)
Мышиное ACI-01-Ab-7-C2	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
химерное AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
гуманизированное H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
гуманизированное H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Пример 11. Иммуногистохимический анализ связывания

11.1. Срезы мозга человека

Мозг здоровых людей, больных на стадии, предшествующей БА без проявления слабоумия, и больных БА получают из Университетской клиники в Бонне после соблюдения этических норм. Мозг фиксируют формальдегидом, и область гиппокампа обезвоживают, погружая в парафин, затем с помощью микротомы нарезают срезы толщиной 5 мкм. Парафиновые срезы хранят при комнатной температуре до применения. Для свежего материала криосекции толщиной 5 мкм нарезают криостатом, и срезы хранят при -80°C до использования.

11.2. Иммуногистохимия

Из срезов в парафине удаляют парафин и проводят обводнение путем погружения срезов в ксилен, затем в 100% этанол, 90% этанол и 70% этанол. Фон понижают путем 30 мин инкубирования в 10% H₂O₂, 10% метаноле в воде. Восстановление антигена производят путем инкубирования срезов в 100% муравьиной кислоте в течение 3 мин. После 3 промываний в трисе в буферном солевом растворе (TBS, pH 7,5), неспецифическую метку блокируют 2-часовым инкубированием срезов в 10% БСА, 0,25% Triton X-100 в TBS. После промывки (3 промывки в TBS) блокируют эндогенные антитела путем добавления немеченого антитела против IgG человека (фирма Biomed) и инкубирования срезов во влажных камерах в течение ночи при комнатной температуре. Еще через 3 промывания первичное анти-амилоидное антитело человека добавляют к среде и инкубируют еще 24 ч при комнатной температуре. После промывания меченое щелочной фосфатазой вторичное антитело против IgG человека (фирма Sigma) добавляют к срезам и инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания срезы обрабатывают красителем Liquid permanent Red (фирма Dakocytomation), промывают водой и высушивают на воздухе до закрепления с постоянной поддерживающей средой (корбитбальзамом).

Криосрезы фиксируют в метаноле в течение 30 мин при -80°C и снижают фон добавлением H₂O₂ к холодному метанолу до конечной концентрации 10% и инкубированием в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех промываний в трис-солевом буфере (TBS, pH 7,5), неспецифическую метку блокируют путем 2-часового инкубирования срезов в 10% БСА, 0,25% Triton X 100 в TBS согласно

указанному выше и проводят окрашивание методом, описанным выше.

Срезы исследуют с помощью микроскопа Leica DMLB и фотографируют, используя камеру Leica DC500 и программное обеспечение Leica FireCam1.2.0.

Оба антитела человека А и С метят бляшки в мозге больных БА (фиг.8). Мечеными являются и диффузные, и коровые бляшки. Кроме того, диффузные бляшки у пациентов без слабоумия, находящихся на стадии, предшествующей проявлению БА, также могут быть выявлены с помощью антител А и С. Амилоид при церебральной амилоидной ангиопатии (cerebral amyloid angiopathy - CAA) несет метку обоих антител и некоторое окрашивание нейронов, которое может соответствовать внутриклеточному амилоиду, также было обнаружено. Метку не выявляют в контрольных образцах мозга от здоровых пациентов. Бляшки могут быть обнаружены на парафиновых срезах, предварительно обработанных муравьиной кислотой, но не было меченых бляшек на парафиновых срезах без предварительной обработки муравьиной кислотой и на криосрезах, фиксированных в метаноле. Антитело В человека не выявляет бляшек на парафиновых срезах, и мышинное антитело не окрашивает ни парафиновые, ни криосрезы мозга человека.

Аббревиатуры:

А = связывающее химерное антитело AF (IgG4)

В = несвязывающее химерное антитело В (IgG4)

С = связывающее гуманизированное антитело H4K1 (IgG4)

Мышь = ACI-01-Ab-C2 мышинное антитело (IgG2b)

Пример 12. Функциональность антитела mC2 на амилоидных волокнах

12.1. Модификация конформации волокон $A\beta_{1-42}$ и инициация дезагрегирования после связывания антитела mC2

Для оценки механизма, с помощью которого антитело может дезагрегировать заранее сформированные бета-амилоидные ($A\beta_{1-42}$) волокна, проводят в непосредственном противостоянии сравнение тиофлавин-Т (Th-T) флуоресцентный анализ, измеряя дезагрегирование, и твердотельный ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) $U-^{13}C$ тирозин 10 и валин12-меченого $A\beta_{1-42}$ пептида, анализируя вторичную конформацию (фиг.9А). Антитело mC2 растворяет 35,4% заранее сформированных $A\beta_{1-42}$ волокон и одновременно индуцирует сдвиг вторичной конформации от бета-слоя к произвольной спирали. Снижение в популяции конформации бета-листов в сторону произвольной спирали составляет примерно 35% и следовательно хорошо согласуется с измерением, используя флуоресцентный Th-T анализ (фиг.9В). Эти данные показывают, что связывание антитела mC2 инициирует переход вторичной структуры, в результате которого возможно происходит дестабилизация параллельной межмолекулярной сборки бета-листов, вызывающая разрушение удлиненных волокон и образование более коротких фрагментов.

12.2. Конформационно-зависимое связывание средства антитела mC2

Поскольку из научной литературы известно, что пропорция антитело-антиген связывающей энергии может быть использована для зависящей от энергии модификации конформации антигена (Blond и Goldberg, 1987), проводят сравнительный эксперимент по связывающему средству C2 антитела с целым $A\beta_{1-42}$ белком и с меньшим, длиной в девять аминокислот, пептидом, включающим эпитоп (фиг.10). Для такого сравнения средство гуманизированного антитела C2 анализируют методом ELISA, используя биотинилированные пептиды, покрывая полную аминокислотную последовательность эпитопа C2 (от фирмы Mimotopes, продажа фирмой ANAWA Trading SA), и

биотинилированный полный A β 1-42 пептид (фирма Bachem). Анализ проводят по инструкциям производителя (фирма Mimotopes). Из фиг.10 следует, что антитело связывается со связывающим сродством, которое на 36,0% выше сродства с пептидом, включающим его специфический эпитоп (аминокислоты 13-21 последовательности A β 1-42), по сравнению с целым белком A β 1-42. Из этого следует, что различие в энергии

связывающего сродства используют для переноса поглощающей энергии вторичной конформации амилоидного белка для презентации антигена в более приемлемом положении для взаимодействия с антителом. Это объясняет, почему сродство антитела ниже к нативному белку (целому амилоидному белку), а не к выделенной субъединице.

Пример 13. Воздействие антиамилоидного антитела hC2 на агрегирование амилоид-бета 1-42 пептида

Для оценки способности гуманизированного моноклонального антитела hC2 против амилоида бета человека опосредовать антиагрегирующее и дезагрегирующее воздействие на амилоид бета (A β) проводят тиофлавин Т спектрофлуоресцентный анализ.

13.1. Исследование подавления агрегирования

Лиофилизированный порошок A β 1-42 восстанавливают в гексафторизопропанол (hexafluoroisopropanol - HFIP) до концентрации 1 мМ. Пептидный раствор обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин при комнатной температуре, перемешивают в течение ночи и аликвоты помещают в микроцентрифужный пробирки (без силикона). Затем HFIP выпаривают под струей аргона. Получаемую пептидную пленку высушивают под вакуумом в течение 10 мин и хранят при -80°C до использования.

Для исследования опосредованного антителом подавления агрегирования A β 1-42 антитело hC2 предварительно разводят в ФСБ, и раствор для исследования, содержащий приведенные ниже компоненты, получают в пробирках без силикона: 3,3 или 0,33 ммоль предварительно разведенного антитела, 10 ммоль тиофлавина Т, 33 ммоль A β 1-42 и 8,2% ДМСО. Следовательно, итоговые молярные соотношения антитела к A β 1-42 составляют 1:10 и 1:100. Также получают соответствующие контрольные растворы. Растворы затем инкубируют в течение 24 ч при 37°C и спектральную флуоресценцию (в относительных единицах флуоресценции - ОЕФ) считают в шести повторах в черных 384-луночных планшетах (фирма Perkin-Elmer) на спектрофлуорометре Perkin-Elmer FluoroCount. Спектральную флуоресценцию затем измеряют и процент дезагрегирования подсчитывают методом, описанным ниже.

13.2. Исследование дезагрегирования

Для анализа опосредованной антителом дезагрегации предварительно агрегированного A β 1-42, низкомолекулярный A β 1-42, приготовленный согласно описанному выше, готовят в виде 110 мМ раствора в 27% ДМСО и 1х ФСБ. Этот раствор затем подвергают агрегированию при 37°C в течение 24 ч, после чего добавляют: 3,3 или 0,33 мМ предварительно разведенного антитела и 10 мМ тиофлавина Т. Это приводит к молярному соотношению 1:10 и 1:100 антитела к A β 1-42. Этот раствор затем инкубируют дополнительно в течение 24 ч при 37°C. Спектральную флуоресценцию затем измеряют, и процент дезагрегирования подсчитывают методом, описанным ниже.

13.3. Расчеты

Подавление агрегирования или дезагрегирования выражают в виде среднего процента подавления или дезагрегирования, соответственно, \pm стандартная ошибка средней величины (СО) по следующему уравнению:

Процент

$$\text{подавления} = \frac{(\text{ОЕФ положительного контроля} - \text{ОЕФ отрицательного контроля}) - (\text{ОЕФ образца подавления с } A\beta 1 - 42 - \text{ОЕФ образца без } A\beta 1 - 42)}{(\text{ОЕФ положительного контроля} - \text{ОЕФ отрицательного контроля})} \cdot 100\%$$

13.4. Результаты

13.4.1. Подавление агрегирования Aβ1-42

Подавление агрегирования Aβ1-42, используя hC2 антитело, показано в табл.1 и на фиг.18. Мольное соотношение антитела к Aβ1-42 1:100 подавляет в среднем на 30% (2 независимых эксперимента), причем при мольном соотношении 1:10 подавление составляет 80% (2 независимых эксперимента, см. табл.1).

Таблица 1

Опосредованное антителом hC2 подавление агрегирования Aβ1-42 при мольных соотношениях 1:100 и 1:10 антитела к Aβ1-42

Антитело	Мольное соотношение (антитела к Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30,0±4,1%	80,4±6,9%

13.4.2. Дезагрегирование предварительно агрегированного Aβ1-42

Дезагрегирование предварительно агрегированного Aβ1-42, используя hC2 антитело, показано в табл.2 и на фиг.19. При мольном соотношении антитела к Aβ1-42 1:100 Дезагрегирование в среднем составляет 24%, а при мольном соотношении 1:10 дезагрегирование составляет 32% (3 независимых эксперимента, см. табл.2).

Таблица 2

Опосредованное антителом hC2 дезагрегирование Aβ1-42 при мольных соотношениях 1:100 и 1:10 антитела к Aβ1-42

Антитело	Мольное соотношение (антитела к Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23,9±4,4%	31,9±3,5%

Применение исследования с тиофлавином Т могут быть показаны бифункциональные свойства анти-Aβ гуманизированного антитела hC2, а именно, подавление агрегирования Aβ1-42 в патогенную протофибриллярную конформацию и кроме того дезагрегирование предварительно сформированные Aβ1-42 протофибриллы. Антитело hC2 ингибирует Aβ1-42 агрегирование на 80% при мольном соотношении антитела к Aβ1-42 1:10. Установлено, что способность hC2 дезагрегировать предварительно агрегированные протофибриллы Aβ1-42 в мольном соотношении 1:10 составляет 32%.

Пример 14. Конформационно-специфическое связывание mC2 с разными классами амилоидных белков

Для оценки специфичности mC2 в отношении разных стадий полимеризованного амилоидного белка, мономерного, полимерного растворимого и фибрильного амилоида, получают планшеты для метода ELISA, с нанесенным полимерным амилоидом на разных стадиях бета-амилоида (фиг.11). Мономеры получают опубликованным модифицированным способом Klein (2002), растворимый полимерный амилоид бета получают способом Barghorn и др. (2005), а волокна получают путем инкубирования амилоида (фирма Bachem, Швейцария) с конечной концентрацией 1 мкг/мкл в Tris/HCl pH 7,4 при 37°C в течение 5 суток с последующей стадией центрифугирования (10000 об/мин в течение 5 мин). Затем амилоидные полимеры наносят на планшеты для ELISA до конечной концентрации 55 мкг/мл и проводят связывающее сродство методом ELISA с применением моноклонального антитела против мышинового IgG (фирма Jackson), меченое щелочной фосфатазой. На фиг.11 показано, что антитело mC2 связывается с повышенным сродством с растворимым полимерным амилоидом бета по сравнению с волокнами и наименьшим образом с мономерами. Эти данные показывают, что на

связывание антитела влияет амилоидный эпитоп и конформация разных амилоидных агрегатов.

Пример 15. Картирование эпитопа АС иммунного моноклонального антитела hC2

Картирование эпитопа гуманизированного моноклонального антитела hC2 проводят методом ELISA, используя три разные пептидные библиотеки. Одна библиотека включает в общей сложности 33 биотинилированных пептида, полностью перекрывающих аминокислотную (aa) последовательность A β 1-42 (от фирмы Mimotopes, продажа фирмой ANAWA Trading SA), вторая библиотека включает биотинилированные пептиды, включая пептид 12 (aa12-20 из A β) из первой пептидной библиотеки, и замещение каждой aa в последовательности на аланин (см. табл.3 ниже), а третья библиотека содержит биотинилированные пептиды 13, 14, или 15 (aa 13-21, 14-22 и 15-23 из A β) и замещение в каждом случае последних аминокислот на аланин или на глицин для aa 21, которые уже представляют аланин (см. табл.4 ниже). Полностью биотинилированный пептид A β 1-42 используют в качестве положительного контроля (фирма Bachem). Картирование эпитопа проводят по инструкциям производителя (фирма Mimotopes). Вкратце, планшеты с покрытием из стрептавидина (NUNC) блокируют с помощью 0,1% БСА в ФСБ в течение ночи при 4°C. После промывки ФСБ-0,05% твин 20 планшеты покрывают в течение 1 ч при комнатной температуре разными пептидами из библиотеки, разведенными в 0,1% БСА, 0,1% азиде натрия в ФСБ до конечной концентрации 10 мкМ. После промывки планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре с антителом hC2 или несвязывающим A β химерным IgG4 антителом, разбавленным до 200 нг/мл в 2% БСА, 0,1% азиде натрия в ФСБ. Планшеты промывают еще раз и инкубируют со щелочной фосфатазой, конъюгированной с козым антителом против IgG человека в течение 1 ч при комнатной температуре. После последнего промывания планшеты инкубируют с фосфатазным субстратом (pNPP) и снимают показания при 405 нм, используя ридер для планшетов ELISA.

Было установлено, что гуманизированное моноклональное антитело hC2 связывается специфически с пептидами 12, 13, 14, 15 и 16 из первой пептидной библиотеки. Эти пептиды представляют aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 и 16-24 соответственно из A β 1-42, следовательно, эпитом расположен в области 12-24 в последовательности A β . Вторую библиотеку с замещениями аланина используют для определения принципиально важных аминокислот (aa) для связывания с A β 12-20 (VHHQKLVFF). Связывание антитела hC2 полностью утрачивается, если аминокислоты 16, 17, 19 или 20 замещены на аланин, свидетельствуя о том, что эти аминокислоты принципиально важны для связывания антитела с A β . Связывание антитела hC2 частично утрачивается, если аминокислоты 15 и 18 замещены.

Связывание также почти полностью утрачивается, если аминокислота 14 замещена на аланин, свидетельствуя о том, что аминокислота 14 также крайне важна для связывания.

В заключении используют третью библиотеку для определения, важны ли аминокислоты 21, 22 или 23 для связывания с эпитопом. Связывание антитела с аминокислотами 15-23 снижается, если аминокислота 23 замещена на аланин, следовательно, аминокислота 23 также важна для связывания. Связывание частично утрачивается, если аминокислота 21 замещается на глицин и незначительно уменьшается, если аминокислота 22 замещена на аланин.

Пример 16. Нейропротекция антителом hC2

Способность антитела hC2 защищать нейроны от Абета олигомер-индуцированной

дегенерации оценивают анализом *in vitro*. Нейроны коры эмбрионов мышей в возрасте 16,5-17,5 суток выделяют, разобщают и культивируют *in vitro* в среде N3-F12. Клетки выращивают в общей сложности в течение 9 суток и вносят питание на 3 сутки и в день, когда добавляют олигомер Абета, или олигомер Абета плюс анти-Абета антитело hC2.

5 На пятые сутки («4 суток Абета») или шестые сутки («3 суток Абета») определенные лунки с клетками обрабатывают либо 2 мкмольями только одного олигомера Абета, либо комбинацией 2 мкмольей олигомера Абета и 50 мкг/мл анти-Абета антитела hC2.

Олигомер Абета получают растворением Абета 1-42 (фирма rPeptide) в HFIP, из раствора Абета пептиды разливают аликвотами по 10 мкл при концентрации 1 мг/мл
10 и затем выпаривают в пароуловителе в течение 30 мин и пептидные пленки хранят при -80°C до использования. При использовании пептидную пленку растворяют в 10 мкл ДМСО, затем 78,6 мкл HAMS F12, и Abeta пептидного раствора инкубируют при 4°C в течение 24-48 ч (конечная концентрация Абета составляет 25 мкМ).

Для контрольных клеток добавляют только ДМСО-F12 в том же объеме, что и
15 Абета-ДМСО на 5 сутки, и клетки культивируют в течение дополнительных 4 суток без дополнительной обработки. На 9 сутки нейроны из всех условий культивирования фиксируют и окрашивают Tuj1 (анти-бета-тубулиновое антитело), затем окрашивают вторичными антителами, мечеными FITC, для визуализации микротрубочек и, таким образом, нейрональный процесс в целом. Результаты представлены на фиг.20.

20 Необработанные эмбриональные нейроны коры мыши показывают нормальные морфологические признаки через девять суток в культуре (фиг.20, крайняя левая панель). Лечение клеток олигомером Абета в течение трех суток индуцирует дегенерацию аксона и вызывает снижение общего числа аксонов (фиг.20, нижняя центральная панель), и этот эффект еще более выражен на четвертые сутки лечения (фиг.20, верхняя центральная
25 панель). Напротив, клетки, обработанные комбинацией Абета олигомера и анти-Абета антитела hC2, выглядят сходно с контрольными клетками (фиг.20, верхняя и нижняя правые панели). Эти результаты показывают, что анти-Абета антитело hC2 способно защитить эмбриональные нейроны коры мыши от Абета-олигомер-индуцированной дегенерации.

30

Таблица 1				
Положения и изменения, произведенные в каркасных участках легкой цепи гуманизированного антитела C2				
Положение легкой цепи	45	87	50	53
Мышиное C2V _K	K	F	K	N
Гуманизированное C2HuVK1	Q	Y	K	N
35 Гуманизированное C2HuV _K 2	Q	F	K	N
Гуманизированное C2HuVK3	K	Y	K	N
Гуманизированное C2HuV _K 4	K	F	K	N
Зародышевой линии человека dpk15	Q	Y	L	N
Мышиное C2V _K -R			R	
40 Мышиное C2V _K -S				S

40

Таблица 2		
Положения и изменения, произведенные в каркасных участках тяжелой цепи гуманизированного антитела C2		
Положение тяжелой цепи	47	94
Мышиное C2VHAF	L	S
45 Гуманизированное C2HuVHAF1	W	R
Гуманизированное C2HuVHAF2	W	S
Гуманизированное C2HuVHAF3	L	R
Гуманизированное C2HuVHAF4	L	S
Зародышевой линии человека DP-54	W	R

45

В общей сложности 8 разных антител было сконструировано с легкими цепями гуманизированных антител C2HuVK1, C2HuV_K2, C2HuVK3, C2HuV_K4 и тяжелыми цепями C2HuVHAF4 и C2HuVHAF2.

5 Таблица 3

Свойства пептидов, используемых во второй библиотеке

Аминокислоты, важные для связывания, обозначены курсивом и подчеркнуты, а аминокислоты, безусловно, важные для связывания, обозначены курсивом и жирным шрифтом

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
Номера аминокислот	12	13	14	15	16	17	18	19	20

20 Таблица 4

Свойства пептидов, используемых в третьей библиотеке

Аминокислоты, важные для связывания, обозначены курсивом и подчеркнуты, а аминокислоты, безусловно важные для связывания, обозначены курсивом и жирным шрифтом

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
Номера аминокислот		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Литература

1. Barghorn S., Nimmrich V., Striebinger A., Krantz C., Keller P., Janson B., Bahr M., Schmidt M., Bitner R.S., Harlan J., Barlow E., Ebert U., Hillen H. Globular amyloid beta-peptid oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95, 2005, cc. 834-847.
2. Blond, Goldberg, PNAS, 84(5), 1987, cc. 1147-1151.
3. Cox J.P.L., Tomlinson I.M., Winter G. A directory of human germ-line Vk segments reveals a strong bias in their usage. Eur. J. Immunol. 24, 1994, cc. 827-836.
4. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest, US Department of Health and Human Services, 1991.
5. Klein W.L., Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5), 2002, cc. 345-352.
6. Langdon S.D., Inakioki M., Kelsoe G., Tedder T.F. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution. Immunogenetics, 51, 2000, cc. 241-245.
7. Milligan R.C., Berg P. Expression of bacterial gene in mammalian cells. Science, 209, 1980, cc. 1422-1427.
8. Reichmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332, 1988, cc. 323-327.
9. Schable K.F., Thiebe R., Bensch A., Brensing-Kueppers J., Heim V., Kirschebaum T., Lamm R., Ohnrich M., Pourrajabi S., Roschentaller F., Schwendinger J., Wichelhaus D., Zocher I., Zachau H.G. Characteristics of immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans

in the mouse genome. Eur. J. Immunol., 29, 1999, cc. 2082-2086.

10. Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B. and Winter G. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops. J. Mol. Biol., 227, 1992, cc. 776-798.

5

Формула изобретения

1. Гуманизированное антитело или его фрагмент, способные специфически связывать β-амилоид, причем гуманизированное антитело или его фрагмент включают:

а) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, представляющую область CDR1 LCVR, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность RVSNRFS или аминокислотную последовательность KVSSRFS, представляющую область CDR2 LCVR, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, представляющую область CDR3 LCVR, или

б) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, представляющую область CDR1 HCVR, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, представляющую область CDR2 HCVR, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, представляющую область CDR3 HCVR, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

при этом гуманизированное антитело или его фрагмент включают Fc область человеческого IgG1, содержащую D265A аминокислотную замену, причем аминокислотная замена приводит к снижению эффекторной функции.

2. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, у которого в аминокислотной последовательности области CDR2 вариабельной области легкой цепи, представленной в виде последовательности SEQ ID NO: 5 Lys в положении 50 по нумерации Kabat замещен на Arg или Asn в положении 53 по нумерации Kabat замещен на Ser.

3. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, причем гуманизированное антитело или его фрагмент включает вариабельные области с производными от каркасного участка человека или примата, и при этом по меньшей мере одна из аминокислот производного от каркасного участка человека или примата изменена путем замещения на аминокислоту из соответствующего участка антитела мыши ACI-01-Ab7C2, продуцируемого гибридомой FP-12H3-C2, депонированной в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры под номером DSM ACC2750, или на соответствующее ей консервативное замещение.

4. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.3, в котором гуманизированное антитело или его фрагмент включает каркасные участки вариабельных областей, производные от каркасных участков человека или примата, и в котором

(а) аминокислота в положении 47 по нумерации Kabat в производной от каркасных участков человека или примата вариабельной области тяжелой цепи является Leu; и/или

(б) аминокислота в положении 94 по нумерации Kabat в производной от каркасных участков человека или примата вариабельной области тяжелой цепи является Ser; и/или

(с) аминокислота в положении 87 по нумерации Kabat в производной от каркасных участков человека или примата варибельной области легкой цепи является Phe и Tyr; и/или

(d) аминокислота в положении 45 по нумерации Kabat в производной от каркасных участков человека или примата варибельной области легкой цепи является аминокислотой, выбранной из группы, включающей Lys и Gln.

5 Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, причем гуманизированное антитело или его фрагмент включают варибельные области с производными от каркасного участка человека или примата, и при этом варибельная область тяжелой цепи (HCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая крайней мере на 98% идентична последовательности, представленной в виде последовательности SEQ ID NO: 15.

10 6. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1, причем гуманизированное антитело или его фрагмент включают варибельные области с производными от каркасного участка человека или примата, и при этом варибельная область легкой цепи (LCVR) имеет аминокислотную последовательность, которая по крайней мере 98% идентична последовательности, представленной в виде последовательности SEQ ID NO: 12.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гуманизированное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6.

8. Нуклеиновая кислота по п.7, включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

9. Вектор экспрессии для получения гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.7 или 8.

25 10. Клетка, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по п.7 или 8, где эта клетка продуцирует гуманизированное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6, способные специфично связывать бета-амилоид.

11. Композиция для лечения амилоидоза, включающая терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6.

30 12. Композиция по п.11, также включающая дополнительное биологически активное вещество в терапевтически эффективном количестве, и/или фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или эксципиент, причем дополнительное биологически активное вещество выбрано из соединений, используемых в лечении амилоидоза, соединений против окислительного стресса, анти-апоптотических соединений, хелаторов металлов, ингибиторов репарации ДНК, например пирензепина и метаболитов, 3-амино-1-пропансульфоновой кислота, 1,3-пропандисульфоната, активаторов α -секретазы, ингибиторов β - и γ -секретазы, тау-белков, нейротрансмиттеров, нарушителей β -слоев, аттрактантов для амилоида бета очищающих/истошающих клеточных компонентов, ингибиторов усеченного по N-концу амилоида бета, включая амилоид бета 3-42 в форме пироглутамата, противовоспалительных молекул и ингибиторов холинэстеразы, например такрина, ривастигмина, донепезила и/или галантамина, агонистов M1 и других лекарственных средств, включая какой-либо амилоид или тау модифицированное лекарственное средство и пищевые добавки, а также необязательно фармацевтически приемлемый носитель, и/или растворитель, и/или эксципиент.

45 13. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.1-6 в терапевтически эффективном количестве, предназначенные для использования при предупреждении, лечении или облегчении воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза.

14. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.13, где лечение субъекта, в

частности млекопитающего или человека с амилоид-ассоциированным состоянием, характеризующимся утратой когнитивного объема памяти, приводит к повышению сохранения когнитивного объема памяти или его полному восстановлению.

15. Способ диагностики амилоид-ассоциированных заболеваний или состояний у субъекта, включающий:

- (а) приведение образца ткани, или специфической части тела, или области тела субъекта, предположительно содержащих амилоидный белок, в контакт гуманизированным антителом или его фрагментом по любому из пп.1-6,
- (б) предоставление возможности для антитела связать амилоидный белок,
- (в) выявление антитела, связанного с белком, и
- (г) корреляцию наличия или отсутствия связывания антитела с наличием или отсутствием амилоидного белка в образце, или специфической области тела субъекта.

16. Способ определения степени нагрузки амилоидогенных бляшек в ткани и/или жидкостях тела субъекта, включающий:

- (а) исследование в указанном образце наличия амилоидного белка с гуманизированным антителом или его фрагментом по любому из пп.1-6,
- (б) определение количества антитела, связанного с белком, и
- (в) подсчет нагрузки бляшек в ткани и/или жидкостях тела субъекта.

17. Тест-набор для выявления и диагностики амилоид-ассоциированных заболеваний и состояний, включающий гуманизированное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6 и необязательно дополнительно включающий инструкции для применения антител с целью связывания амилоидного белка для формирования иммунологического комплекса и выявления формирования таким образом, что наличие или отсутствие иммунологического комплекса коррелирует с наличием или отсутствием амилоидного белка.

18. Способ продуцирования гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6, включающий культивирование клеток, содержащих вектор экспрессии по п.9.

19. Применение гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6 в терапевтически эффективном количестве при изготовлении лекарственного средства для предупреждения, лечения или облегчения воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза.

20. Способ предупреждения, лечения или облегчения воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза, включающий введение нуждающегося в этом субъекту гуманизированного антитела или его фрагмента по любому из пп.1-6 в терапевтически эффективном количестве.

21. Композиция по п.11, где композиция включает терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела или его фрагмента и необязательно дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

22. Композиция по п.12, где композиция включает терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела или его фрагмента и необязательно дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

23. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.13 в терапевтически эффективном количестве, предназначенное для использования при предупреждении, лечении или облегчении воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза, где амилоидозом является нейродегенеративное расстройство, такое как болезнь Альгеймера.

24. Гуманизированное антитело или его фрагмент по п.13 в терапевтически

эффективном количестве, предназначенное для использования при предупреждении, лечении или облегчении воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, где амилоидозом является болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз, диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли, бета амилоид-индуцированная нейронная деградация и дегенерация желтого пятна.

25. Применение гуманизированного антитела или его фрагмента по п.19 в терапевтически эффективном количестве для приготовления лекарственного средства, предназначенного для использования при предупреждении, лечении или облегчении воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза, где амилоидозом является нейродегенеративное расстройство, такое как болезнь Альцгеймера.

26. Применение гуманизированного антитела или его фрагмента по п.19 в терапевтически эффективном количестве для приготовления лекарственного средства, предназначенного для использования при предупреждении, лечении или облегчении воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, где амилоидозом является болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз, диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли, бета амилоид-индуцированная нейронная деградация и дегенерация желтого пятна.

27. Способ предупреждения, лечения или облегчения воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза по п.20, где амилоидозом является неврологическое расстройство, например болезнь Альцгеймера (БА).

28. Способ предупреждения, лечения или облегчения воздействия одного или нескольких эффектов амилоидоза по п.20, где амилоидоз выбирают из группы, включающей болезнь диффузных поражений телец Леви, синдром Дауна, наследственное цереброспинальное кровоизлияние с амилоидозом (типа Dutch), комплекс паркинсонизм-деменция Гуама, прогрессирующий супрануклеарный паралич, рассеянный склероз, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Паркинсона, слабоумие, связанное со СПИД, амиотропный латеральный склероз, диабет взрослых, старческий кардиальный амилоидоз, эндокринные опухоли, бета амилоид-индуцированная нейронная деградация и дегенерация желтого пятна.

29. Клетка, включающая вектор экспрессии по п.9, где эта клетка продуцирует гуманизированное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6, способное(ый) специфично связывать бета-амилоид.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АЦ ИММУНЕ

<120> ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К АМИЛОИДУ БЕТА

<130> M1967 EP S3

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR1) гуманизированной тяжелой цепи C2 HuVH AF 4

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR2) гуманизированной тяжелой цепи C2 HuVH AF 4

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR3) гуманизированной тяжелой цепи C2 HuVH AF 4

<400> 3

Gly Asp Tyr

1

<210> 4

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR1) гуманизированной легкой цепи C2 HuVH AF 4
C2 HuVK 1

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR2) гуманизированной легкой цепи C2 HuVH AF 4
C2 HuVK 1

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Вариабельная область(CDR3) гуманизированной легкой цепи C2 HuVH AF 4
C2 HuVK 1

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Аβ эпитоп, область 2

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Аβ эпитоп, область 1

<400> 8

His Gln Lys Leu Val

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (1)..(1)

<223> Хаа может означать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (4)..(4)

<223> Хаа может означать Ala, Val, Leu, Ser или Ile

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (5)..(5)

<223> Хаа может означать Glu или Asp

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (6)..(6)

<223> Хаа может означать Glu или Asp

<400> 9

Хаа Phe Phe Хаа Хаа Хаа

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (1)..(1)

<223> Хаа может означать His, Asn, Gln Lys или Arg

<220>

<221> Измененные свойства

<222> (2)..(2)
 <223> Хаа может означать Asn или Gln
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может означать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile
 <400> 10
 Хаа Хаа Lys Leu Хаа
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может означать His, Asn, Gln Lys или Arg
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа может означать Asn или Gln
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа может означать Ala, Val, Leu, норлейцин, Met, Phe или Ile
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может означать Ala, Val, Leu, Ser или Ile
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа может означать Glu или Asp
 <220>
 <221> Измененные свойства
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа может означать Glu или Asp
 <400> 11

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

<210> 12

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 HuVK 1 варибельная легкая цепь

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 219

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 легкая цепь

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 14
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Искусственная гуманизированная константная область C2 легкой цепи
 <400> 14
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 15

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 HuVH AF 4 переменная тяжелая цепь

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 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 Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 16

<211> 439

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 тяжелая цепь

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 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 Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 115 120 125
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 180 185 190
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

385 390 395 400
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435
 <210> 17
 <211> 326
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Модифицированная область цепи C IG гамма-4
 <400> 17
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 18

<211> 51

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Варибельная область(CDR2)C2 HuVH AF 4 гуманизированной тяжелой цепи

<400> 18

agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19

<211> 9

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Варибельная область(CDR3)C2 HuVH AF 4 гуманизированной тяжелой цепи

<400> 19

ggtgactac 9

<210> 20

<211> 49

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<223> Варибельная область(CDR1)C2 HuVK 1 гуманизированной легкой цепи

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atataagtaac ggagacacct atttacatt 49

<210> 21

<211> 635

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 Hu VK 1 варибельная легкая цепь

<400> 21

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctgggtga gcctgcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaac gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagttc caaccgattt 180
tctgggtgcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaa 336

<210> 22

<211> 657

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 легкая цепь

<400> 22

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctgggtga gcctgcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaac gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagttc caaccgattt 180
tctgggtgcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtgaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 23

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Константная область искусственной гуманизированной C2 легкой цепи

<400> 23

```
aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct   60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag   120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aatcccagg agagtgtcac agagcaggac   180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag   240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag   300
agcttcaaca ggggagagtg t                                     321
```

<210> 24

<211> 798

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 HuVH AF переменная тяжелая цепь

<400> 24

```
gagggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtcagc ctggagggtc cctgagactc   60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct   120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat   180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac   240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac   300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca                               336
```

<210> 25

<211> 1317

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная гуманизированная C2 тяжелая цепь

<400> 25

```
gagggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtcagc ctggagggtc cctgagactc   60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct   120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat   180
```

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tctcagctt ccaccaaggc ccatccgtc 360
 ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accgggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcgtgcaca cttccccggc tgtctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg 540
 gtgaccgtgc cctccagcag ctgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtcccca 660
 tgcccagcac ctgagtctct ggggggacca tcagtctcc tgttcccc aaaaccaag 720
 gacactctca tgatctccc gaccctgag gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccag 780
 gaagacccc aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 840
 acaaagccgc gggaggagca gttaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaaggcctc 960
 ccgtctcca tcagaaaaac catctccaa gccaaaggc agccccgaga gccacaggtg 1020
 tacacctgc ccccatcca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaggtc tctaccccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaccacgcc tccgtctc gattccgacg gctcctctt cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317
 <210> 26
 <211> 981
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Константная область искусственной гуманизированной C2 тяжелой цепи
 <400> 26
 gttccacca agggcccatc cgtctcccc ctgggccct gctccagatc gacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctggtaag gactacttc ccgaaccgtg gacgggtcgc 120
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttc cggtgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctga acgtatgta caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 300
 aaatatggtc ccccggttc cccatgcca gcacctgag tctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcagtcac 540
 cgtgtggta gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggta gcctgacctg cctgtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt cctcgattcc 840
 gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27

<211> 112

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<400> 27

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> 28

<211> 112

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<400> 28

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> 29

<211> 336

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 29

gatgttgta tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgtatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctggggctcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 30

<211> 417

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 30

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttcagat ctagttagag cctgtatat agtaatggag acacctattt acattgttac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttcaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggagacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttcttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31

<211> 336

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 31

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tctca 336

<210> 32

<211> 408

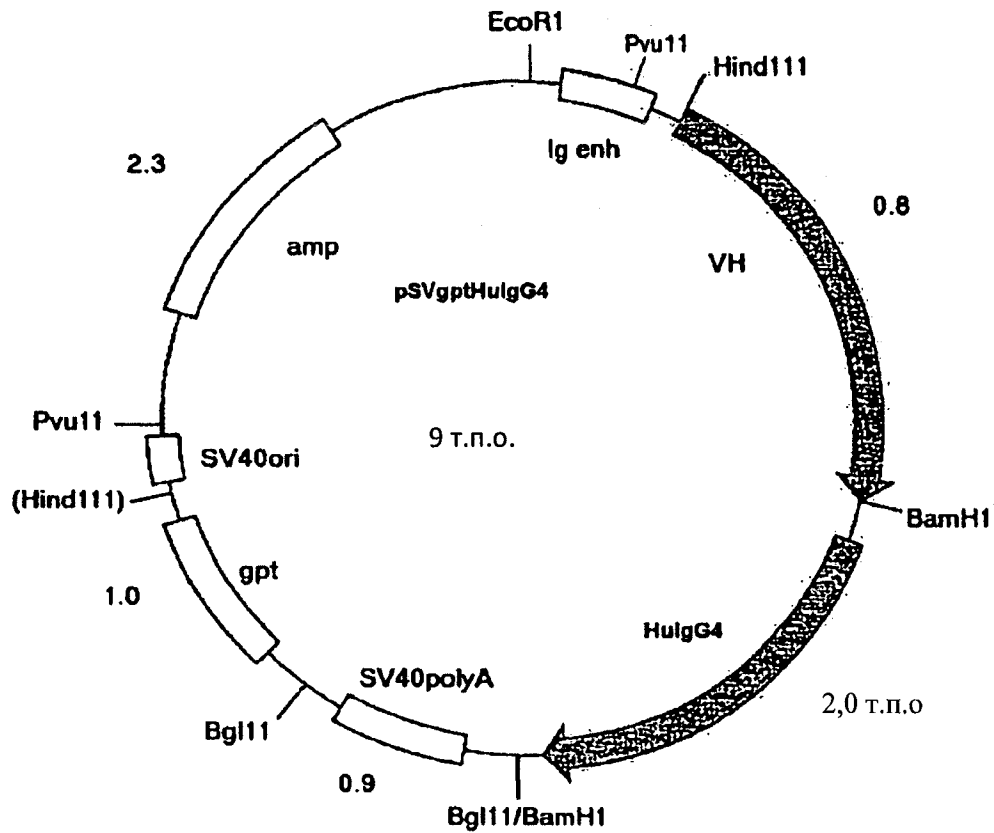
<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 32

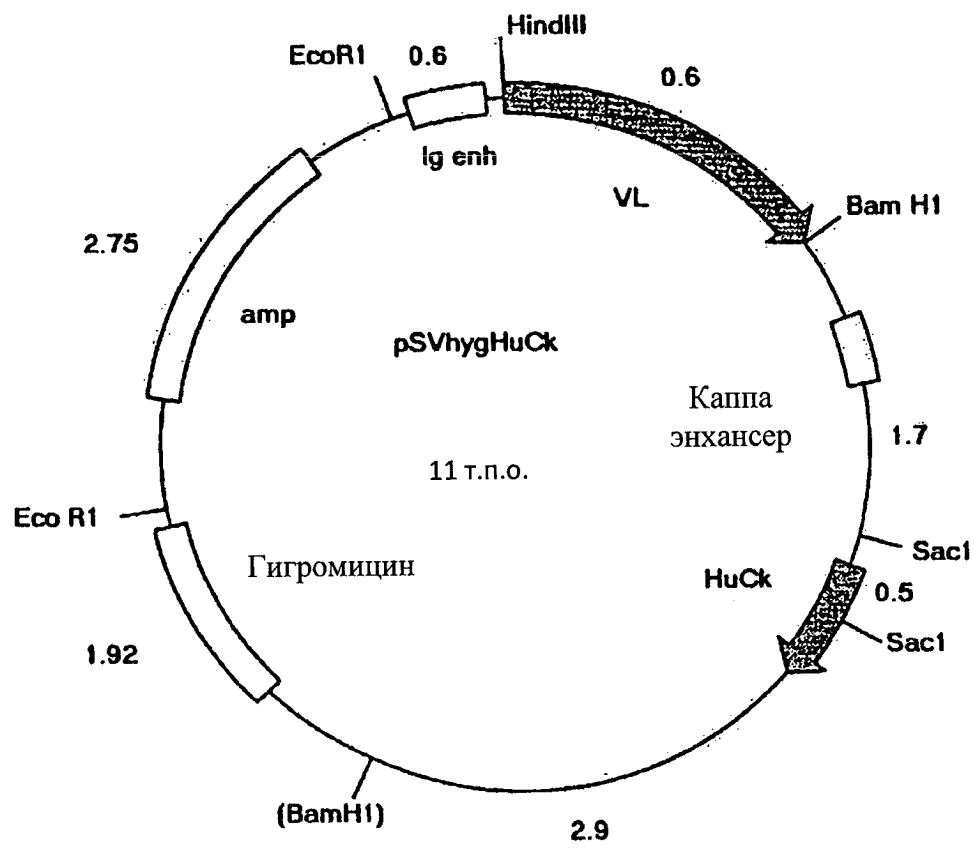
```

atgrasttsg ggytcagmtt grtttctctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag   60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggctcct gaaactctcc  120
tgtgcagcct ctggattcac tttagtagc tatggcatgt ctgggttcg ccagactcca  180
gacaagaggc tgggaattggt cgcaagcacc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca  240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac  360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc               408
    
```



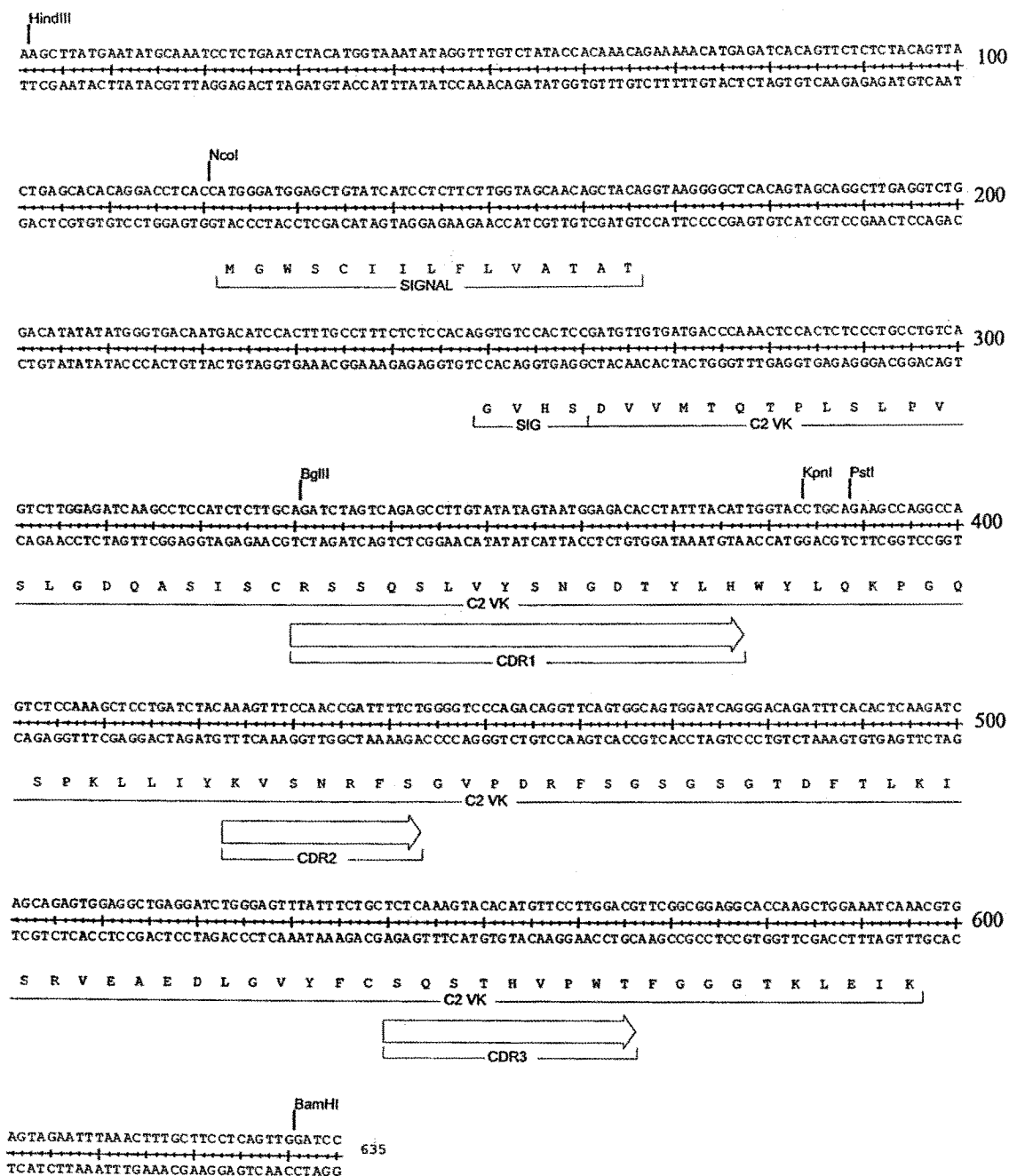
(пример 2)

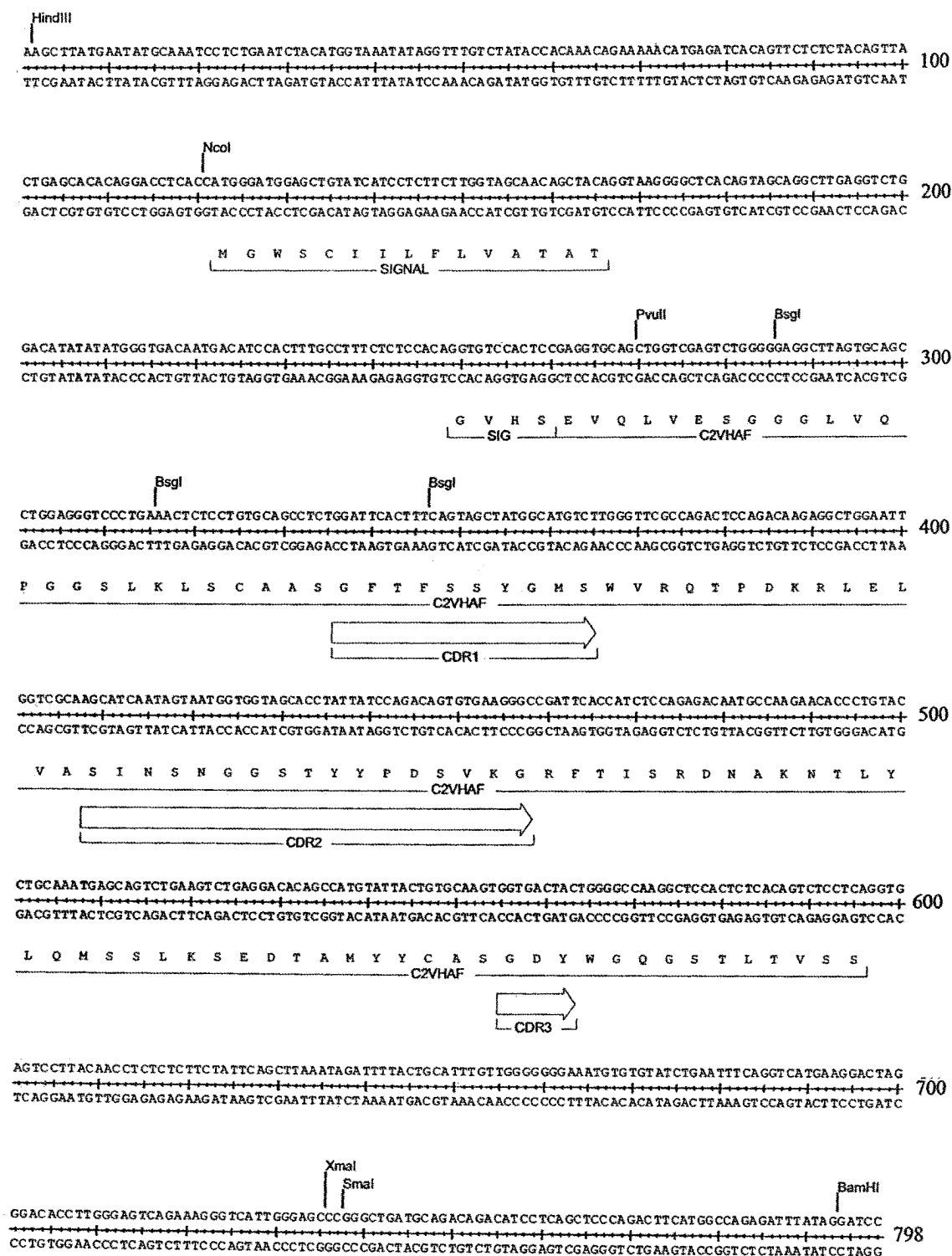
Фиг. 1



(пример 2)

Фиг. 2

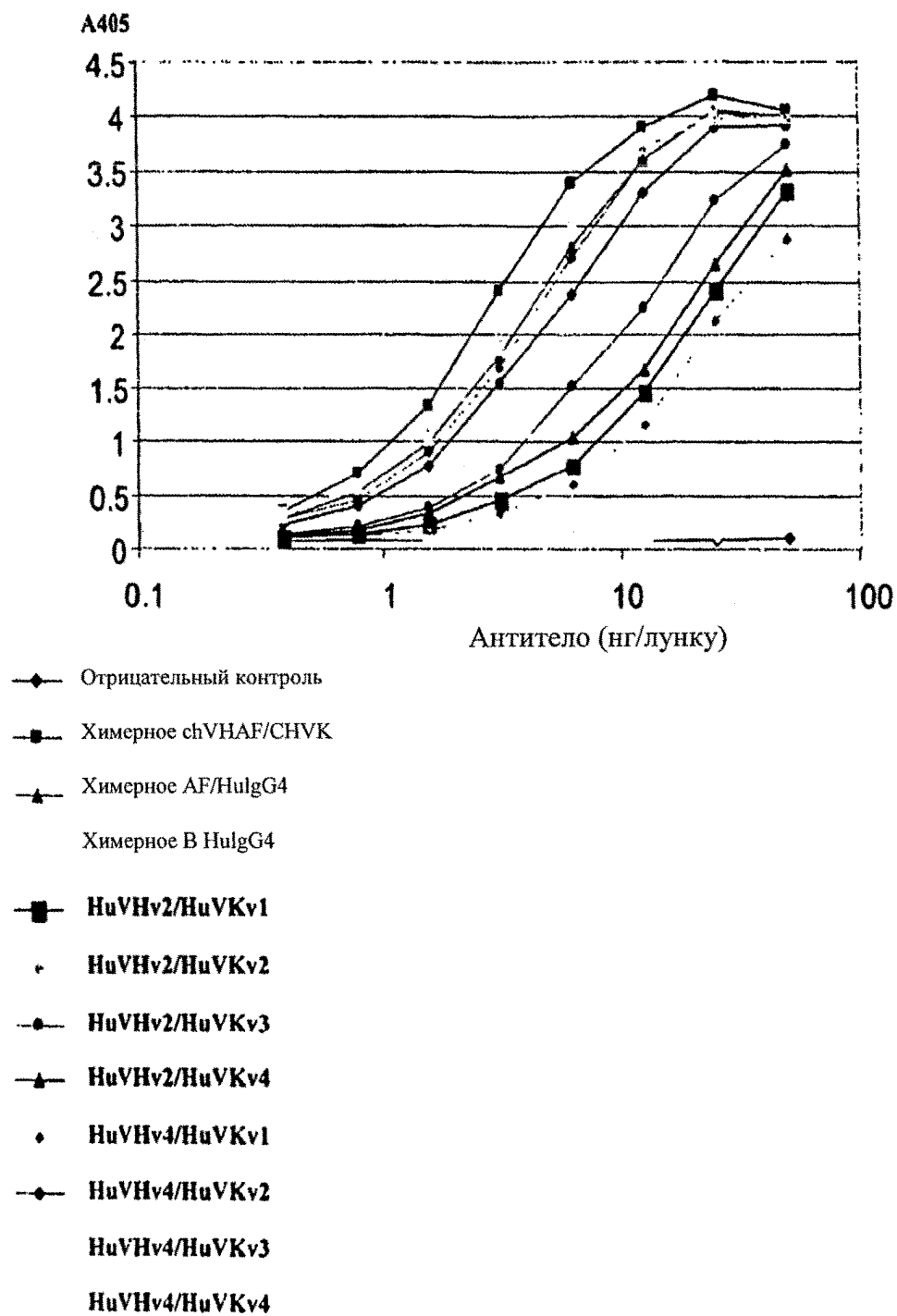




		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
AF120466	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
AF120466	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	Y	T	Y	Y
		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
AF120466	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
		100		110																										
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S								
AF120466	T	A	M	Y	Y	C	A	R	R																					

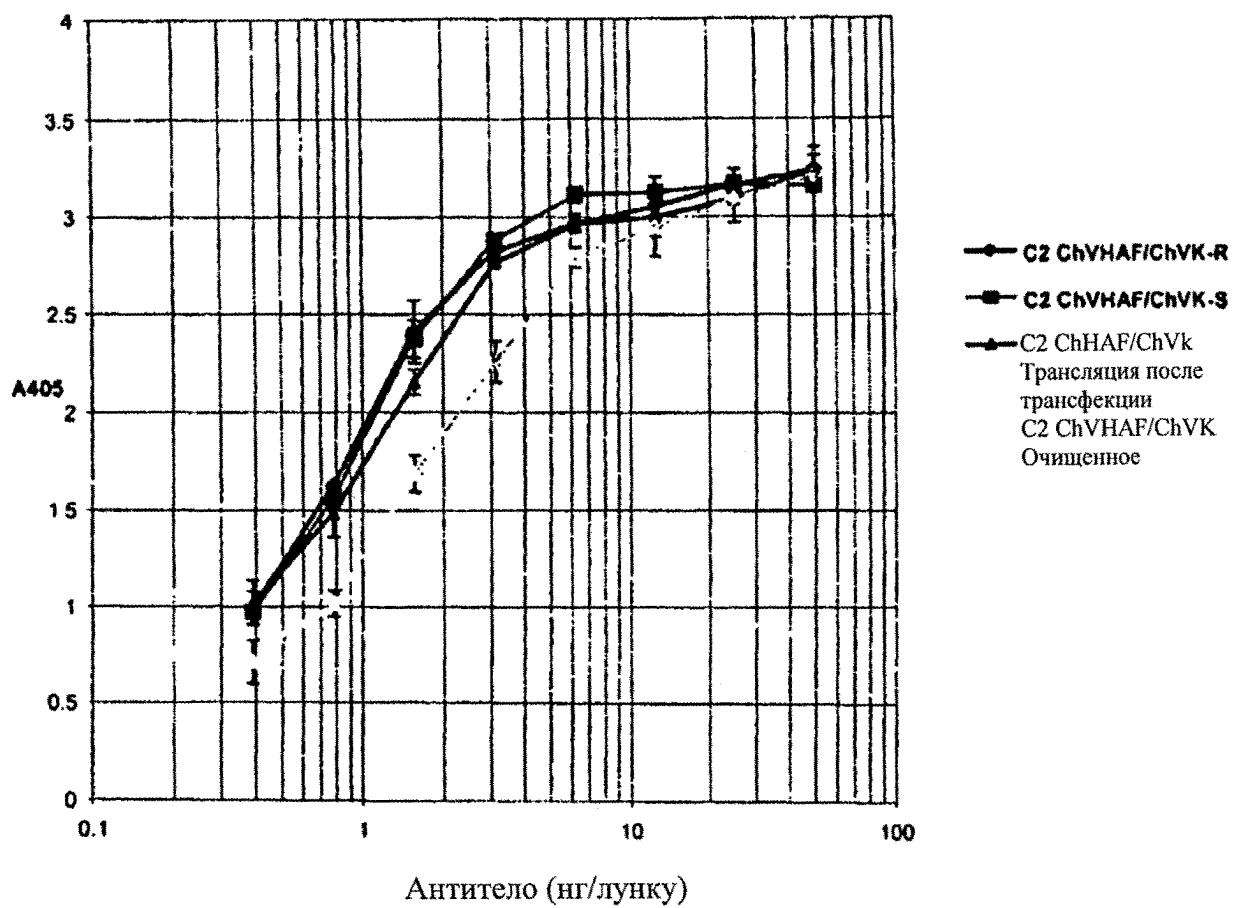
(пример 5.2)

Фиг. 5



(пример 8)

Фиг. 6



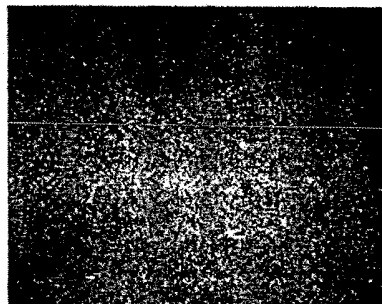
(пример 9)

Фиг. 7

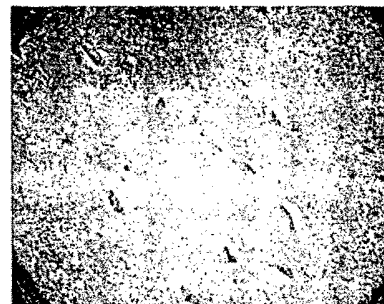
С: антитело hC2

А: химерное антитело

Контрольный пациент

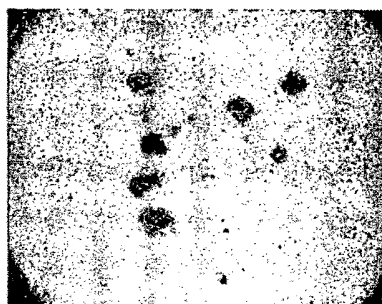


Область Temporal neocortex I, 40x

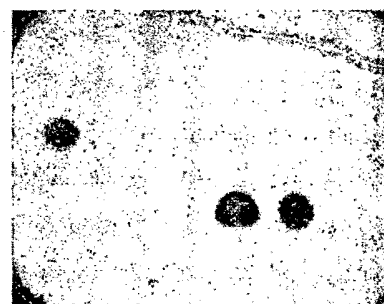


CA4 (область Cornu ammonis 4), 40x

Пациент с БА

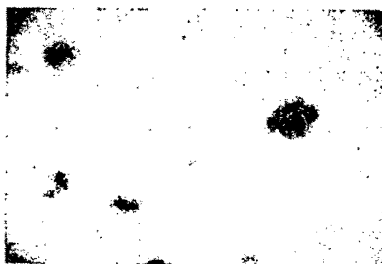


Область Temporal neocortex I, 40x

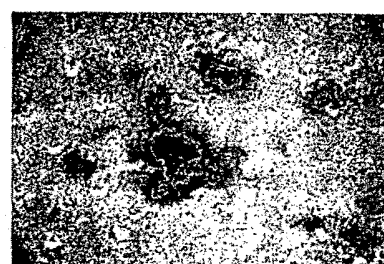


Область Temporal neocortex I, 40x

Пациент на стадии,
предшествующей
проявлению БА



Область Temporal neocortex I, 40x



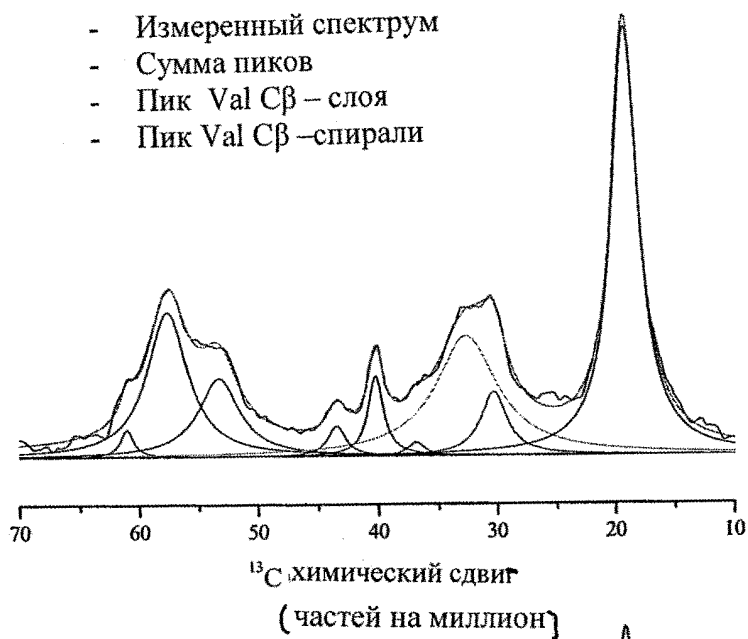
Область Temporal neocortex I, 40x

(пример 11)

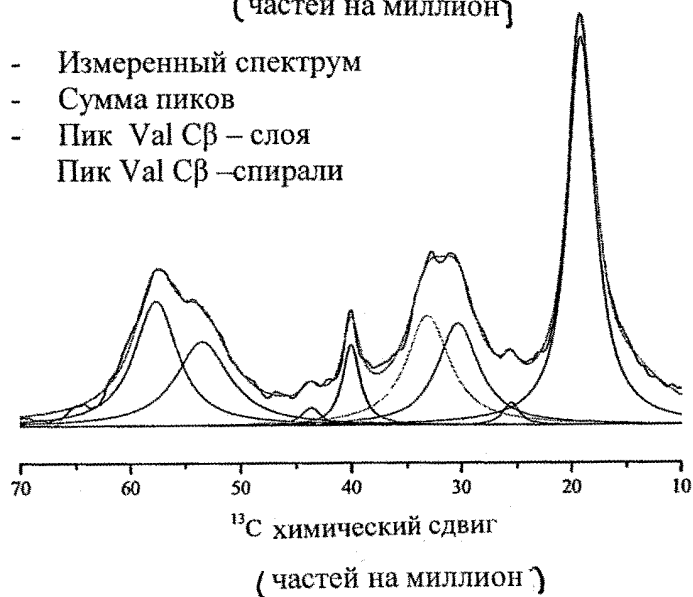
Фиг. 8

А)

- Измеренный спектр
- Сумма пиков
- Пик Val C β – слоя
- Пик Val C β –спирали



- Измеренный спектр
- Сумма пиков
- Пик Val C β – слоя
- Пик Val C β –спирали



В)

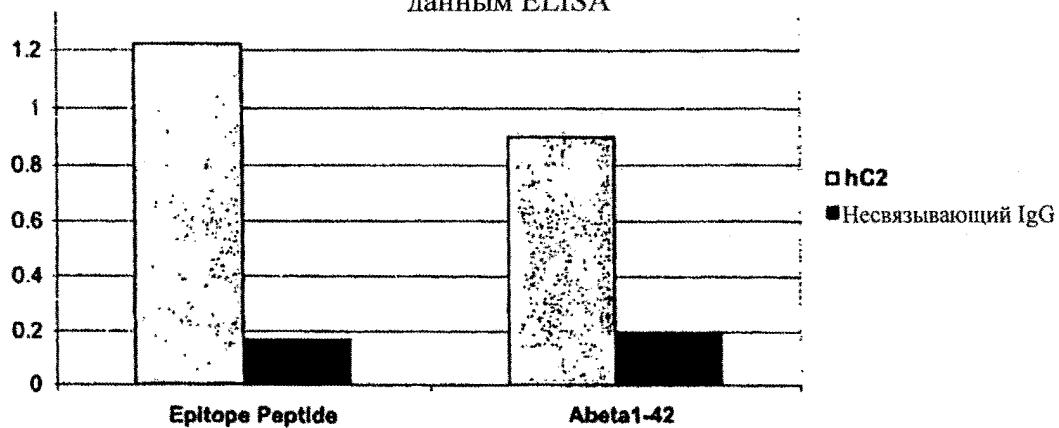
Резонанс	ФСБ			Антитело С2 мыши		
	δ ISO (частей на миллион)	FWHM (Hz)	% интегральной интенсивности	δ ISO (частей на миллион)	FWHM (Hz)	% интегральной интенсивности
Val C β - слой	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val C β - редкая спираль	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

(пример 12)

Фиг. 9

ОП

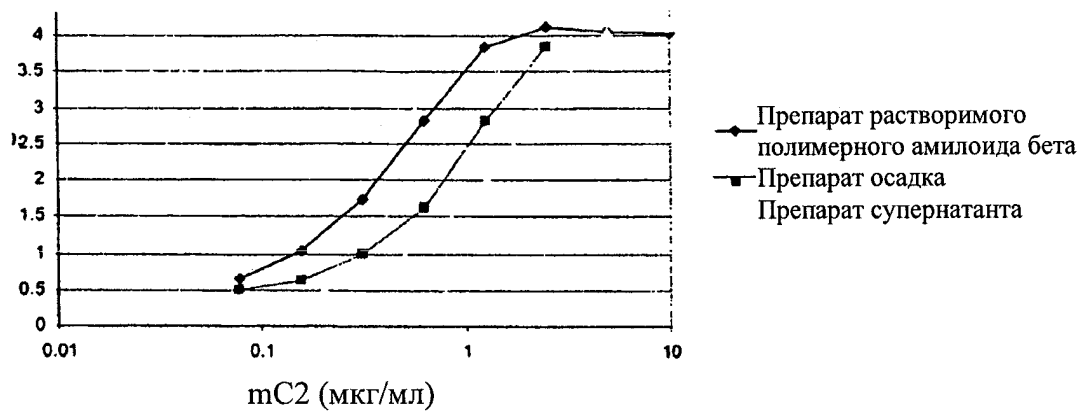
Связывающее сродство гуманизированного C2 по
данным ELISA



(пример 12)

Фиг. 10

ОП



(пример 13)

Фиг. 11

	10	20	30
C2VK	D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R	S S Q S L V	
C2HuVK1	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R	S S Q S L V	
C2HuVK2	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R	S S Q S L V	
C2HuVK3	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R	S S Q S L V	
C2HuVK4	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R	S S Q S L V	
dpk15	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R	S S Q S L L	
JK1	- - - - -	- - - - -	

	40	50	60
C2VK	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y	K V S N R F	
C2HuVK1	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y	K V S N R F	
C2HuVK2	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y	K V S N R F	
C2HuVK3	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y	K V S N R F	
C2HuVK4	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y	K V S N R F	
dpk15	H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y	L G S N R A	
JK1	- - - - -	- - - - -	

	70	80	90
C2VK	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V		
C2HuVK1	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK2	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK3	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK4	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
dpk15	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
JK1	- - - - -	- - - - -	

	100	110
C2VK	Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K	
C2HuVK1	Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK2	Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK3	Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK4	Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
dpk15	Y Y C M Q - - - - - A - L Q T P	
JK1	- - - - - W T F G Q G T K V E I K	

Фиг. 12

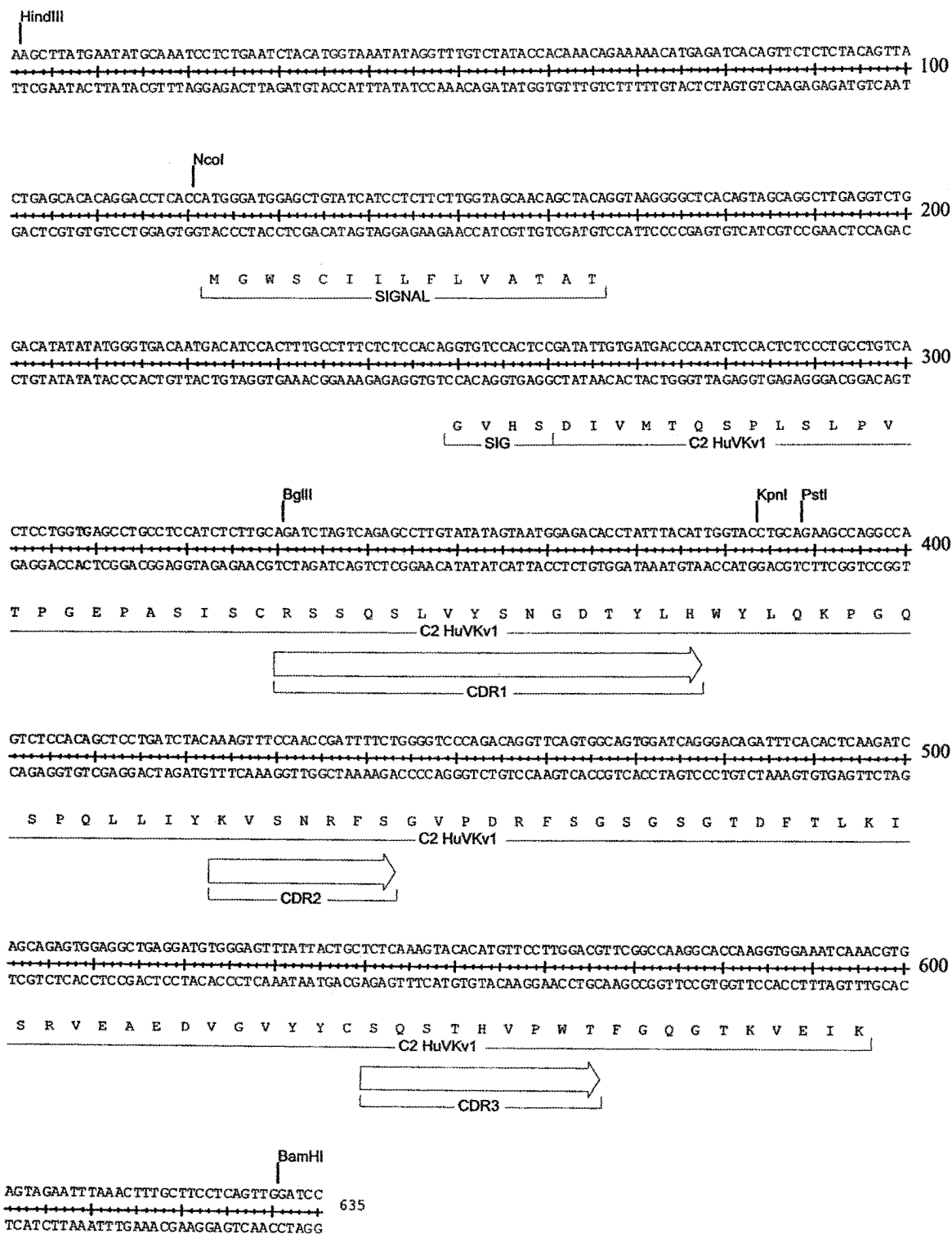
		10	20	30																										
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF4	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
DP-54	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		40	50	60																										
C2VHAF	S	Y	G	M	S	N	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF1	S	Y	G	M	S	N	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF2	S	Y	G	M	S	N	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF3	S	Y	G	M	S	N	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF4	S	Y	G	M	S	N	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
DP-54	S	Y	W	M	S	N	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y

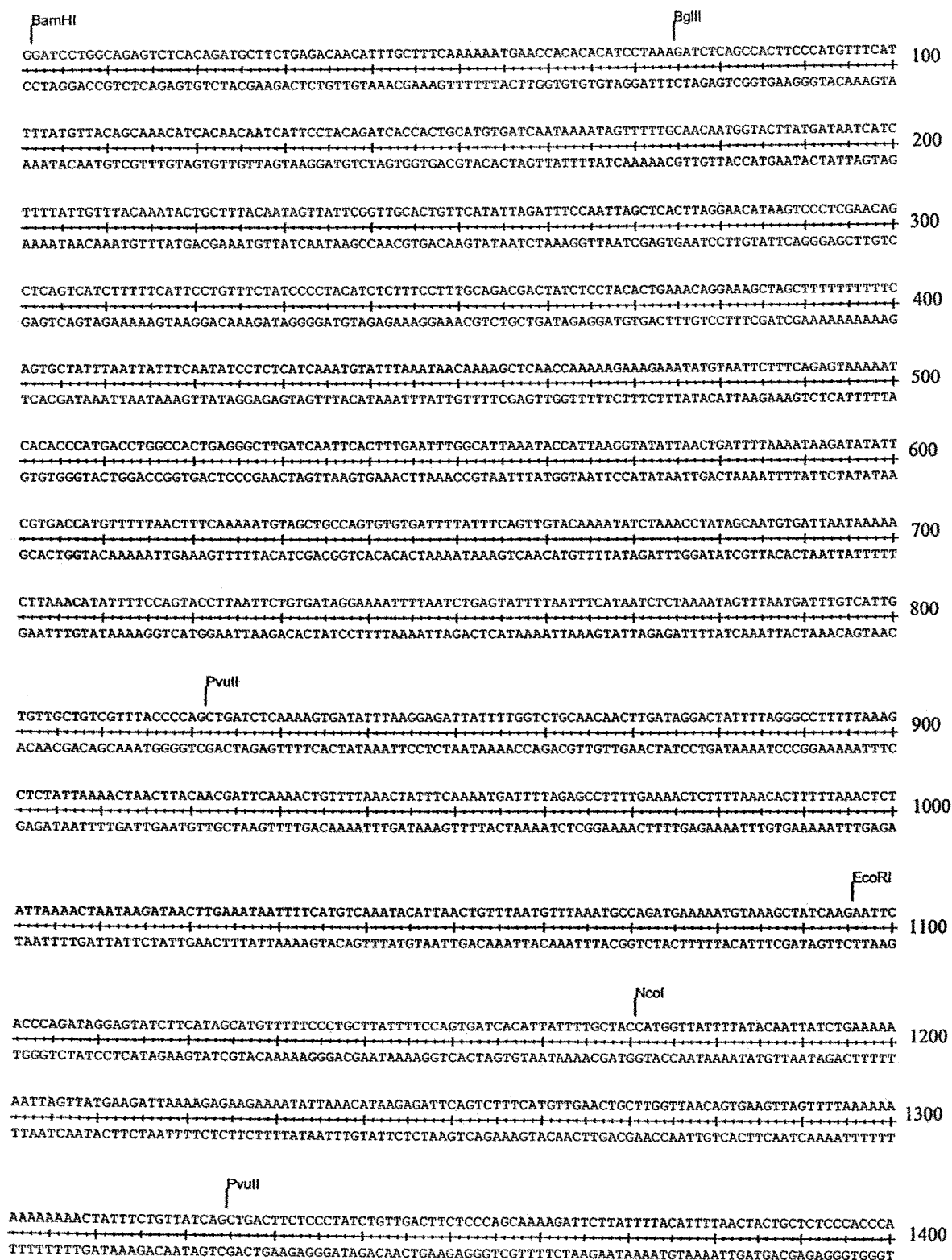
		70	80	90																										
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
C2HuVHAF1	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF2	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF3	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF4	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
DP-54	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		100	110																			
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S
C2HuVHAF1	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF2	T	A	V	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF3	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF4	T	A	V	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
DP-54	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
HUJH6	-	-	-	Y	Y	Y	G	M	-	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S

Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15-1


Стр.: 120

CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCTCTCTCTCTGG 2600
 GGGAGGGTAGGAAACCGGAGACTGGGAAAAGGTGTCCCTGGATGGGATAACGCCAGGAGGTCGAGTAGAAAGTGGAGTGGGGGGAGGAGGAGGAACC
 CTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAAAGTGAATCTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTCTCATTATAAATTATTATCTGTTGTTT 2700
 GAAATTAATACGATTACAACCTCTCTTACTTATTATTCTACTTAGAAACGTGGACACCAAGAGAGAAAGGAGTAAATTATTATAATAGACAACAAA
 TACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCTTAAGGCGCATAACCATTATAAAAAATCATCTTCATTCTATTTTACCCCTATC 2800
 ATGGTTGATGAGTTAAAGAGAATATTCCCTGATTTATACATCAGTAGGATTCCGCGTATTGGTAAATATTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAATGGGATAG
 ATCCTCTGCAAGACAGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCAGTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCCTTGTTTCCCTCTCT 2900
 TAGGAGACGTTCTGTCAGGAGGGAGTTTGGGTGTTTCGGAAGACAGGAGTGTACGGGGACCCGGTACCATCCTCTGTAACGAAGGAACAAAAGGGGAGGA
 CAGCAAGCCCTCATAGTCTCTTTTAAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATTCCTGAGAATCAACCAAGCAAATTTTCAAAG 3000
 GTCGTTCCGGGAGTATCAGGAAAATTCACACTGTCCAGAATGTCAGTATATAGGAAACAAAGTTAAGGACTCTTAGTTGGTTTCGTTTAAAGAGTTTC
 AAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTTCATTGCAACATGATATAAAATAACAACACAATAAAGCAATTAAATAAACAAACAATAGGGAAATGTTAAGT 3100
 TTCTTTGGACGATATTCTCTTAGTAAGTAACGTTGTACTATATTTATGTTGTGTTATTTCGTTAATTATTGTTTGTATCCCTTACAAATTCA
 TCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATGCCTTATTACATTTTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTT 3200
 AGTAGTACCATGAATCTGAATTACCTTACAGTACGGAATAAATGTAATAAATTGTCCATGACTCCCTGAGGACAGCGGTTCCCGGCATAACTCATGAAA
 CCACAACCTAATTTAATCCACACTATACTGTGAGATTAAAAACATTCATTAAAAATGTTGCAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTCTATAAC 3300
 GGTGTTGGATTAAATTAGGTGTGATATGACACTCTAATTTTGTAGTAATTTTACAACGTTTCCAAGATATTTCGACTCTCTGTTTATATAAGATATTG
 TCAGCAATCCCACTTCTAGATGACTGAGTGTCCCAACCCACCAAAAACTATGCAAGAATGTTCAAAGCAGCTTTATTTACAAAAGCCAAAAATTGGAAG 3400
 AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGGTGGGTGTTTGTGATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAAATAAATGTTTTCGGTTTTTAACCTTT
 TAGCCCGATTGTCCAACAATAGAATGAGTTATTAACCTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCAATGAGGAGAATTAACAAGCTACAACATACCTTAC 3500
 ATCGGGCTAACAGGTTGTTATCTTACTCAATAATTGACACCATACAAAATATGTAATCTTATGGGTTACTCCTCTTAATTGTTTCGATGTTGATATGGATG
 TCACACAGATGAATCTCATAAAAAATAATGTTACATAAGAGAACTCAATGCAAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTCATCCATATAAAGTTCAAAACAGGT 3600
 AGTGTGTCTACTTAGAGTATTTTATTACAATGTATTCTCTTTGAGTTACGTTTTCTATACAAGACATACAAAGTAGGTATATTCAAGTTTGGTCCA
 AAAAAATAAGTTAGAAATTTGGATGGAAATTACTCTTAGCTGGGGGTGGGCGAGTTAGTGCTGGGAGAAGACAAGAAGGGGCTTCTGGGGTCTTGGTAA 3700
 TTTTATTCAATCTTTAAACCTACCTTAAATGAGAATCGACCCCAACCGCTCAATCACGGACCTCTTCTGTTCTTCCCGAAGACCCAGAACCATT
 TGTTCTGTTCTCGTGTGGGTTGTGCAGTTATGATCTGTGCACTGTTCTGTATACACATTATGCTTCAAAATAACTTCACATAAAGAACATCTTATACC 3800
 ACAAGACAAGGAGCACACCCCAACACGTCATACTAGACACGTGACAAGACATATGTGTAATACGAAGTTTATTGAAGTGATTCTTGTAGAATATGG
 CAGTTAATAGATAGAAGAGGAATAAGTAATAGGTCAAGACCATGCAGCTGGTAAGTGGGGGGGCTGGGATCAAAATAGCTACCTGCCTAATCCTGCCCTC 3900
 GTCATTATCTATCTCTCTTATTCTTATTCCAGTTCTGGTACGTGACCATTCACCCCCCGGACCTAGTTTATCGATGGACGATTAGGACGGGAG

Фиг. 15-3


TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCCTTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACACAGGCCTGCTATTTTCTGGCATCTGTGCCCTGTTTGGCTAGCTAGGA 4000
 AACTCGGGACTTACTCAGACGGAAGGTCCCGAGTTCACGAGTTGTTTGTGTGCGGACGATAAAGGACCGTAGACACGGGACAAACCGATCGATCCTT
 GCACACATACATAGAAATTAAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGGACAGAGGACAGAATTAACCTTGCCCAGACACTGGAAACCCATGTATGAACACTCA 4100
 CGTGTGTATGTATCTTAATTTACTTTGTCTGGAAGTCGTTCCCTGTCTCTGTCTTAATTGGAACGGGTCGTGACCTTTGGGTACATACTTGTGAGT
 CATGTTTGGGAAGGGGAAGGGACATGTAAATGAGGACTCTTCTCATTTCTATGGGGCACTCTGGCCCTGCCCTCTCAGTACTCATCCATCCAACAC 4200
 GTACAAACCTTCCCTTCCCGTGTACATTTACTCCTGAGAAGGAGTAAGATACCCCGTGAGACCGGGACGGGAGAGTCGATGAGTAGGTAGGTTGTG
 ACCTTTCTAAGTACCTCTCTCTGCCTACACTCTGAAGGGGTTCAAGGAGTAACACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTTGTCTGCT 4300
 TGGAAAGATTCTGGAGAGAGACGGATGTGAGACTTCCCAAGTCTCATTTGATTGTGTCGTAGGGAAGGGAGTTTACTGACTGGTAGGGAACAGGACG
 TTTGTTTTCTTTCCAGTCAGTACTGGGAAAGTGGGAAGGACAGTCATGGAAAACTACATAAGGAAGCACCTTGCCCTTCTGCCTCTTGAGAATGTTG 4400
 AAACAAAAGAAAGGTCACTCATGACCTTTCACCCCTTCTGTGAGTACCTTTTGTATGATTCCTTCGTGGAACGGGAAGACGGAGAATCTTACAAAC
 ATGAGTATCAAACTTTTCAAACTTTGGAGGTTTGAAGTGGGTGAGACTCAGTAATGTCCCTTCCAATGACATGAACCTTGCTCACTCATCCCTGGGGGCC 4500
 TACTCATAGTTTGAAGGTTTGAACCTTCAAACTCATCCCACTCTGAGTCATTACAGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGAAGTAGGACCCCGG
 AAATTGAACAATCAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAATTCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTGAAGGGAAACCCACCATAACCTAAGCAAG 4600
 TTTAACTTGTAGTTTCCGTCGATATTAGGTCAATACCTTAAGTTTGAAGAAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTTGGGTGGGTATTGGATTCTGTT
 TGAAGACAGGTGCTGCAGTGGGAATTGTGTCCTTCAAAAAGGTATGCTCAACTCCTTGCTCTTGGTACTCATAAATGGGTACATAAATGTGACTTTATT 4700
 ACTTCTGTCCACGACGTCCACCTTAACACAGGAAGTTTTCATACGAGTTGAGGAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGTATTTACACTGAAATAA
 TGGAAATAGGGTCTTTGCAGAGGTAATCAAGTCAAAATTAGGTCACTGAAATGTTTGTGAGGATGCGGTGAAAAATGGATCAATCATATATTGCTGGTG 4800
 ACCTTTATCCAGAAACGTCCTCATTAGTTCAGTTTAAATCCAGTATGACTTTACAACACTCCTACGCCACTTTACCTAGTAAGTATATAACGACCAC
 GGAATATAAAAGGGTATAGCTACTCTAGAAAATAGTTGTGAGTTTCTTGA AAAA ACTAAACAAAAGACACCTACCATATGACCCAGGAATTGTACTCCTTG 4900
 CCTTATATTTCCCATATCGATGAGATCTTTATCAACAGTCAAAGAAGTTTGTGATTGTTTCTGTGGATGGTATACTGGGTCTTAACATGAGGAAC
 GGAATTTACCCCAAGGAATAAAACTTATGTCCACACAGAACCCATACATGATTGTTACAGCAGCTTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAAGAGCCA 5000
 CCTTAAATGGGGTCTTTATTTTGAATACAGGTGTGCTTGGGTATGTAACAAGTGTGTCGAAATAAACAACATCGGTTTCGATCTTTCTCGGT
 ACCCATCCCTCAATAGGCAACTAGCCTAACAAATTGTAATATATCCATGCCATAGAAATGCTATGAGGCAATAAAAAGGAACGAAGTGTGATACAGAGAA 5100
 TGGGTAGGAGTTATCCGTTGATCGGATTGTTTAAACATTATATAGGTACGGTATCTTACGATACTCCGTTATTTTCTTCTTCACTATGTCTCTT
 CTGGAGTGATTCTGAAGGACTTTCTACTGAGTGAAAAAGCCAATCTGAAAGGGTCACATACCATGTGATTCTTTTATGTAACATTGTTGAAGTGACAA 5200
 GACCTCACTAAGACTTCTGAAAGATGACTCACTTTTTTCGGTTAGACTTTCCAGTGTATGGTACACTAAGGAAAATACATTGTAACAACCTCACTGTT

Фиг. 15-4




AATTATAGGGATAGAGAACAGATCTCTGGTTGOCAGGGGTAGGGTGGTGGAGAAAGAGTAGGOGAAACTATAAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA 5300

TTAATATCOCTATCTCTGTCTAAGACCAAGGTCCCAATCCACACCTCTTTCTCTCATCCGCTTTGATATTTCCCTCTAGAAACACTAGTACCT



TAAATCTGTATCTTGATTCAGTGGTAGTTGCAGGCATCTAGACATGTGATAAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTATCAATGTCAAATCTTG 5400

ATTTAGACATAGAACTAACGTACCATCAAGTCCGTAGATCTGTACACTATTTACTGTATCTTGACATGTGTGAATAAAATAGTTACAGTTTAAGAAC



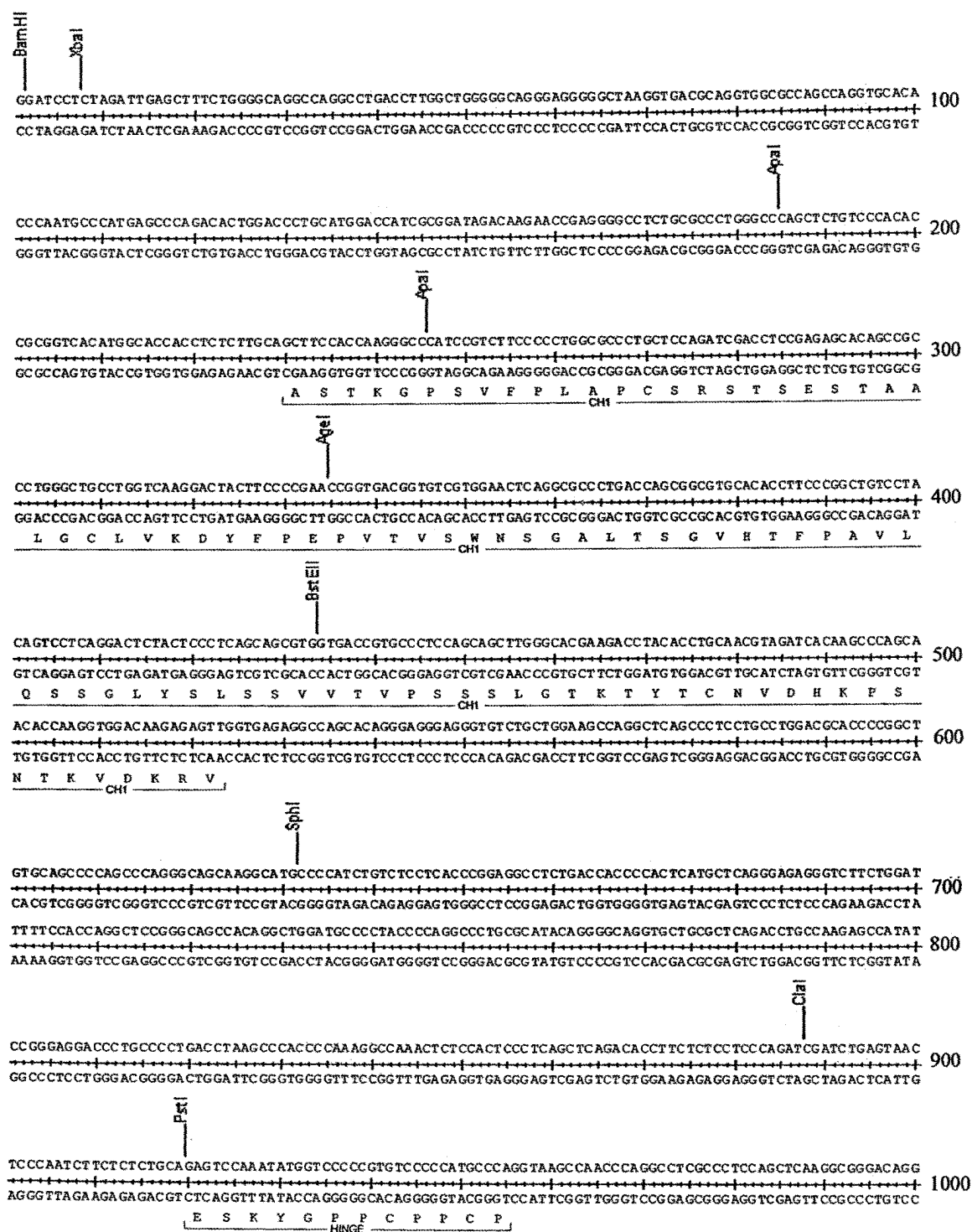
GTTTAAATATCGTACTGTAATTACGTAAAGTAACCAACAGGAGAACTGGGTGCAGGACATCAGAACCTCTGTGCTTTATATCTGTCTTTGCTACT 5500

CAAAATTATAGCATGACATTAAATGCATCTTCATTTGGTTGTCTCTTTGACCCAGTCTGTGTAGTCTGGAGACACGAAATATAGGACAGAAACGATGA

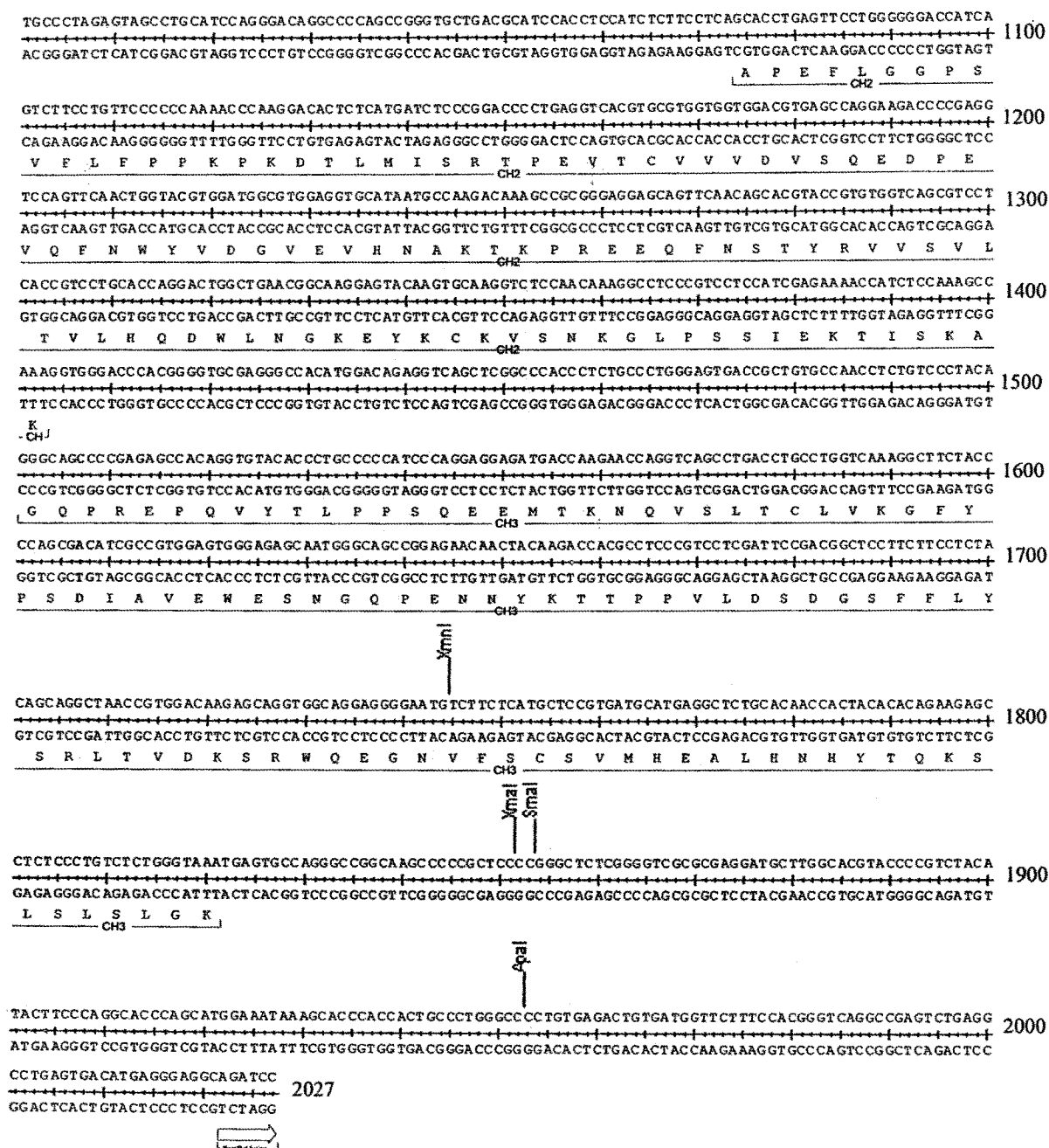
TTCTGTGAATCTATAATTATTTCCAAATAATTTTTTAAACTTTTTTTTATGCTGGATCG 5561

AAGACACTTAGATATTAATAAAGGTTTATTAAAAAATTTGAAAAAATACGACCTAGC

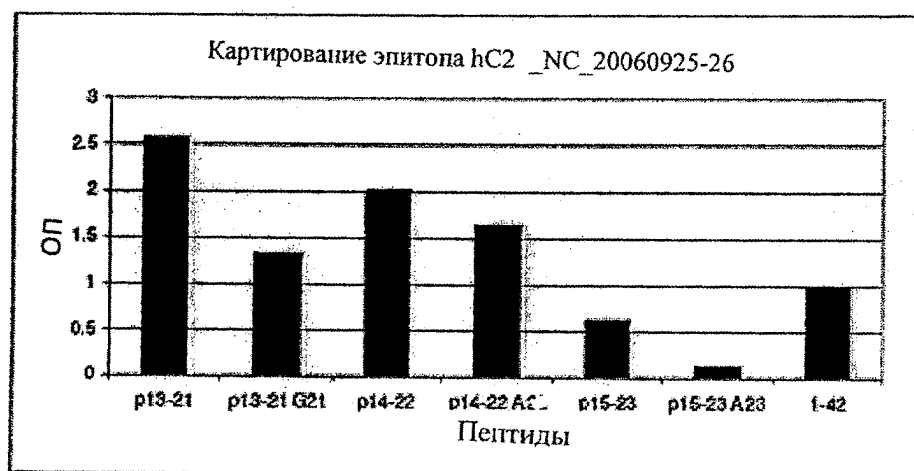
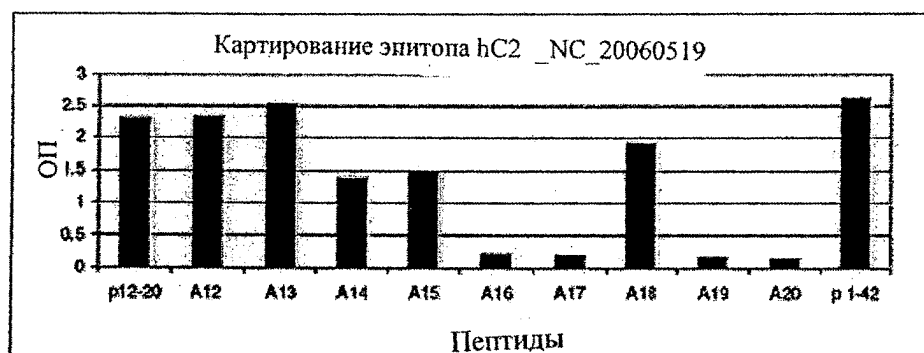
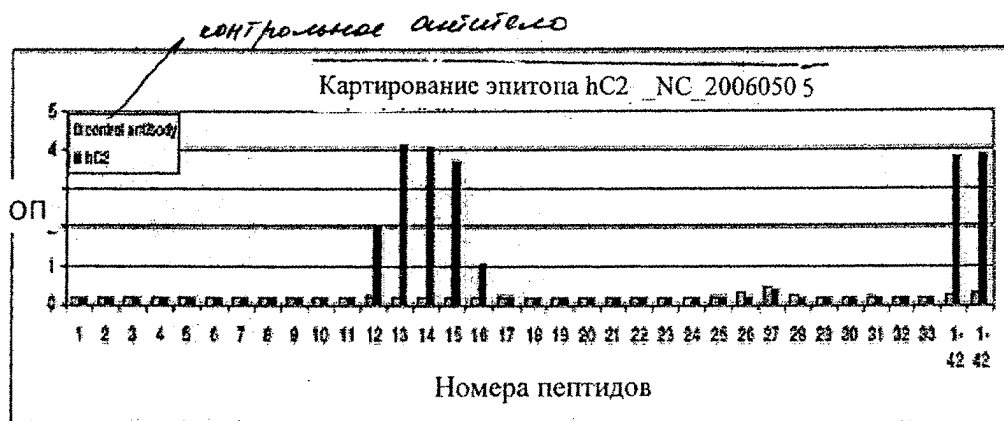
Фиг. 15-5



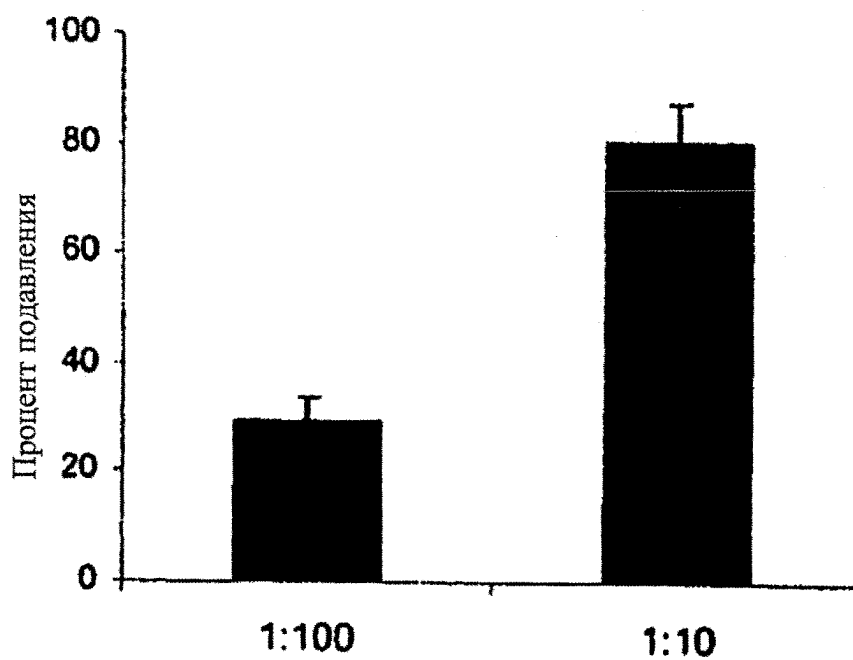
Фиг. 16-1



Фиг. 16-2

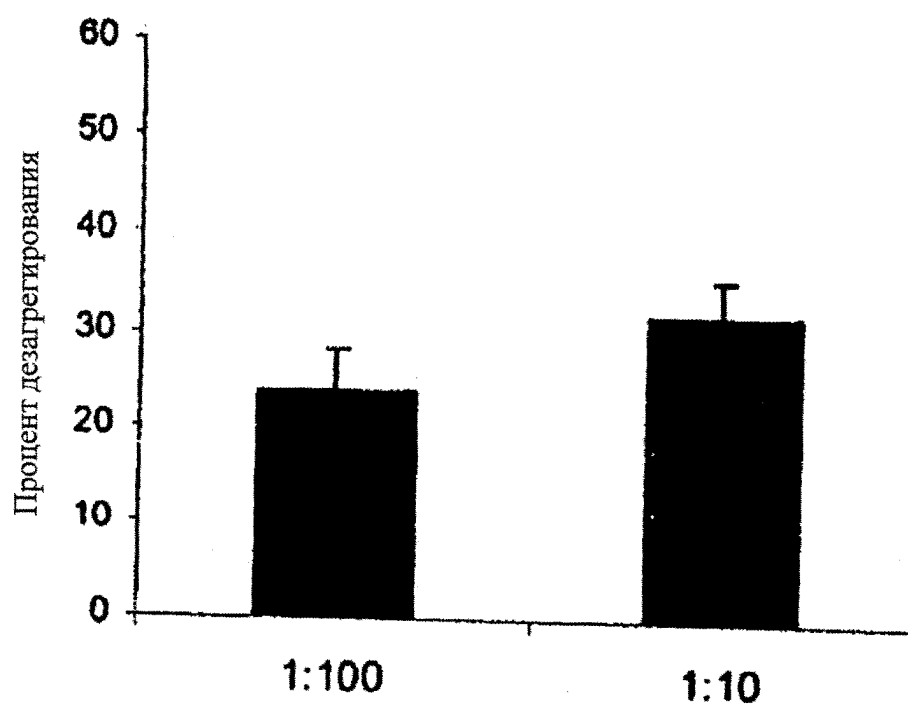


Фиг. 17



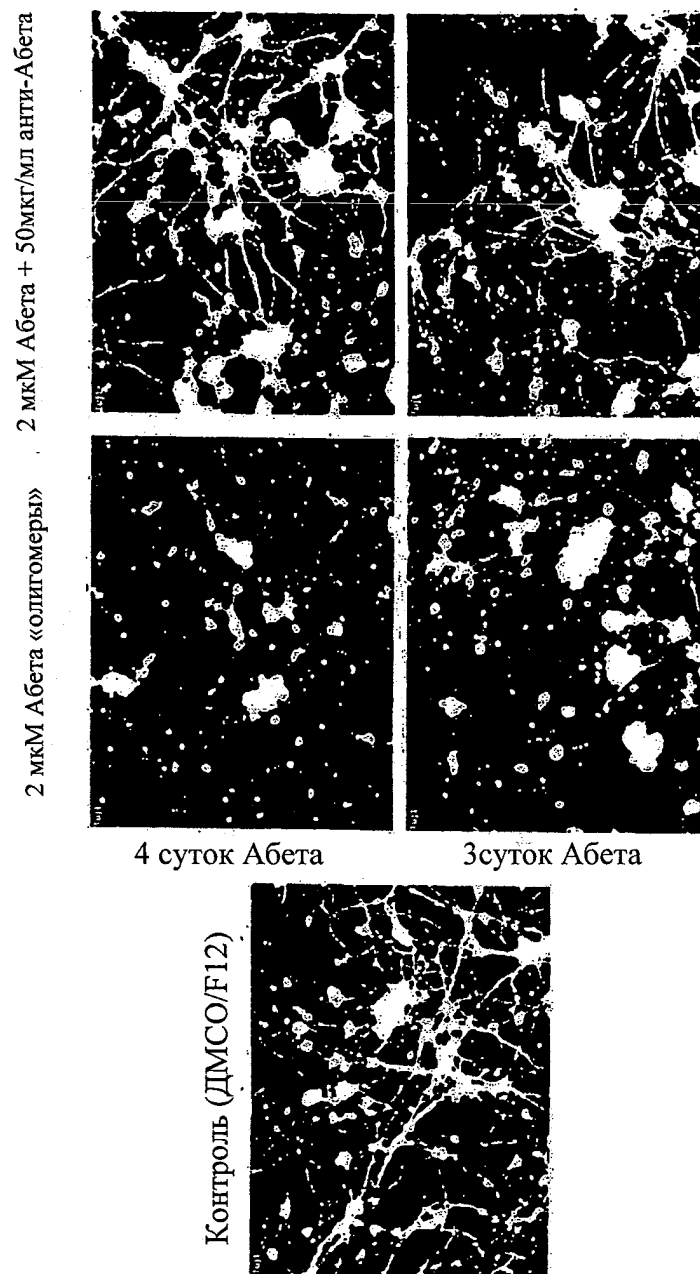
Мольное соотношение антитела: Абета1-42

Фиг. 18



Мольное соотношение антитела: Абета1-42

Фиг. 19



Фиг. 20