



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20080430 B1

HR P20080430 B1

(12) PATENTNI SPIS

(51) MKP:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/30 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(45) Datum objavljivanja patenta:

16.12.2016.

(21) Broj prijave patenta: P20080430A

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 03.09.2008.

(43) Datum objavljivanja prijave patenta u HR: 30.11.2008.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US01/06191
Datum podnošenja međunarodne prijave 26.02.2001.

(87) Broj međunarodne objave: WO 01/62801
Datum međunarodne objave 30.08.2001.

(31) Broj prve prijave: 60/184,601
60/254,465
60/254,498

(32) Datum podnošenja prve prijave: 24.02.2000.
08.12.2000.
08.12.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US
US

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta: P20020693A 22.8.2002

(73) Nositelj patenta:

Washington University, One Brookings Drive, 63110 St. Louis, MO, US
Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, 46285 Indianapolis, IN, US
David M. Holtzman, 368 Sunway, 63141 St. Louis, MO, US
Ronald Demattos, Apartment #12S, 4949 West Pine Boulevard, 63110 St. Louis, MO, US

(72) Izumitelj:

Kelly R. Bales, 6376 S. 1000 E., 46120 Cloverdale, IN, US
Steven M. Paul, 1145 Laurelwood, Carmel, 46032 IN, US
Naoya Tsurushita, 3719 Redwood Circle, Palo Alto, 94306 CA, US
Maximiliano Vasquez, 3813 Louis Road, 94303 Palo Alto, CA, US

(74) Zastupnik:

Hraste & Partneri odvjetničko društvo, 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

HUMANIZIRANA PROTUTIJELA KOJA SADRŽE PEPTID $\alpha\beta$

HR P20080430 B1

OPIS IZUMA**Reference za povezane aplikacije**

- 5 Ovaj izum zadržava pravo na prioritet sadržaja United States provizornih aplikacija 60/184,601 objavljene 24. veljače 2000., 60/254,465, objavljene 8. studenog 2000. i 60/254,498 objavljene 8. studenog 2000, ovdje uključenih u obliku reference.

Stanje tehnike

- 10 Izum se odnosi na humanizirana protutijela koja se vežu za epitope između aminokiselina 13 i 28 peptida A β i na preventivno i terapijsko liječenje stanja povezanih s beta amiloidom, poput Alzheimerove bolesti, Downovog sindroma i cerebralne amiloidne angiopatije. Poblje, izum se odnosi na korištenje humaniziranih monoklonskih protutijela za izdvajanje peptida amiloid beta (A β) u plazmi, mozgu i cerebrospinalnoj tekućini da bi se spriječila akumulacija, odnosno povratno odlaganje peptida A β u mozgu i cerebrovaskulaturi te da bi se poboljšala kognicija.

Pozadina izuma

- 20 Veliki broj simptoma koji rezultiraju kognitivnim nedostatkom, udarom, krvarenjem u mozgu, i općom mentalnom debilitacijom izgleda da je povezan s neuralnim i cerebrovaskularnim plakovima u mozgu, koji sadrže amiloidni beta peptid (A β). Među ovim stanjima nalaze se obje preklinička i klinička Alzheimerova bolest, Downov sindrom, i preklinička i klinička cerebralna amiloidna angiopatija (CAA). Amiloidni plakovi formiraju se od amiloidnih beta peptida. Ti peptidi cirkuliraju krvlju i cerebrospinalnom tekućinom (CSF), u pravilu u obliku kompleksa s lipoproteinima. Peptid A β u cirkulirajućem obliku sastavljen je od 39-43 aminokiseline (najčešće 40 ili 42 aminokiseline) koje nastaju cijepanjem zajedničkog prekursorskog proteina, amiloidnog prekursorskog proteina, često označenog kao APP. Neki oblici topivih A β sami su neurotoksični i mogu određivati težinu neurodegeneracije i/ili smanjenja kognicije (McLean, C. A., *et al.*, *Ann. Neurol.* (1999) 46:860-866; Lambert, M. P., *et al.* (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283:1571).

- 30 Dokazi ukazuju na to da A β prelazi barijeru između mozga i krvi (Ghersi-Egea, J-F., *et al.*, *J. Neurochem.* (1996) 67:880-883; Zlokovic, B. V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) 67:1034-1040; Shibata M., *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2000) 106:1489-1499). Nadalje, u plakovima se A β nalazi u ravnoteži s topivim A β u mozgu i krvi (Kawarabayashi T., *et al.*, *J. Neurosci.* (2001) 21:372-381).

- 35 Kao što je opisano u aplikacijama PTC US00/35681 i U.S. serijski broj 09/153,130, od kojih su obje ovdje uključene u obliku referenci, razine ukupnog cirkulirajućeg peptida A β u CSF su slične kod zdravih pojedinaca i onih predisponiranih za ispoljavanje simptoma Alzheimerove bolesti. No, razine A β_{42} su u prosjeku niže kod pojedinaca s Alzheimerovom bolesti (Nitsch, R. M., *et al.*, *Ann. Neurol.* (1995) 37:512-518). Poznato je da je A β_{42} skloniji agregaciji nego A β_{40} , i kada se to dogodi, ima različite posljedice, poput odlaganja A β u amiloidnim plakovima, pretvorbe A β u topive toksične oblike, oštećenje živčanih stanica i pogoršanje ponašanja, poput demencije uslijed toga (Golde, T. E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* (2000) 1502:172-187).

- Postupci za poticanje imunološkog odgovora da bi se smanjile naslage amiloida opisani su u publikaciji PCT WO99/27944, objavljenoj 10. lipnja 1999. Opis postavlja hipotezu da bi agregirani peptid A β cijele dužine bio koristan imunogen. Administracija odsječka A β (aminokiseline 13-28) konjugiranog s anti-mišjim IgG iz ovce nije uzrokovao promjenu u naslagama amiloida u kori mozga, i samo je jedna od devet životinja koje su primile injekcije konjugiranog A β odsječka 13-28 pokazala limfoproliferaciju kao odgovor na A β_{40} . Izum također upućuje na to da bi protutijela koja specifično vežu peptid A β mogla biti korištena kao terapijski agensi. No, to se čini kao spekulacija, budući da podaci koji to podupiru prikazuju protokole koji uključuju aktivnu imunizaciju korištenjem, na primjer, A β_{42} . Peptidi se daju uz korištenje adjuvanata i titra protutijela dobivenih imunizacijom, kao što se određuju razine peptida A β i prekursorskog peptida. Publikacija čvrsto upućuje da se plak A β mora reducirati da bi se otklonili simptomi Alzheimerove bolesti i da su za uspješno smanjivanje plaka A β potrebni procesi posredovani stanicama.

- WO 99/60024, publiciran 25. studenog 1999. usmjeren je na postupke za uklanjanje amiloida korištenjem anti-amiloid protutijela. Tvrdi se da mehanizam koristi sposobnost protutijela anti-A β da se veže za ranije stvorene amiloidne naslage (tzv. plakove) što zatim rezultira u čišćenju mikroglija od lokalnih plakova. Mehanizam nije dokazan *in vivo*. Ta publikacija nadalje tvrdi da protutijela anti-A β , da bi bila djelotvorna u uklanjanju plakova A β , moraju imati pristup parenhimu mozga i prelaziti barijeru između krvi i mozga.

Nekoliko izuma PCT koji se odnose na pokušaje da kontroliraju amiloidne plakove objavljeno je 7. prosinca 2000. WO 00/72880 opisuje značajno smanjivanje plakova u kori mozga i hipokampusu u transgeničnim miševima koji su modeli za Alzheimerovu bolest, kada su liječeni korištenjem N-terminalnih odsječaka peptida A β i protutijela koja se na njih vežu, ali ne i kada su obrađeni s odsječkom 13-28 peptida A β konjugiranim na anti-mišje protutijelo IgG iz ovce ili s protutijelom na odsječak 13-28, protutijelom 266. Tvrdi se da protutijela usmjerena na N-kraj peptida prelaze barijeru između krvi i mozga i da potiču fagocitozu amiloidnih plakova u studijama *in vitro*.

WO 00/72876 daje gotovo isti zaključak kao i WO 00/72880 i usmjeren je na imunizaciju sa samim fibrilnim komponentama amiloida.

WO 00/77178 opisuje protutijela koja su bila dizajnirana da kataliziraju hidrolizu β -amiloida, uključujući protutijela razvijena na smjesu fenilalaninskog tranzicijskog spoja statina Cys-A β ₁₀₋₂₅, statin Phe₁₉-Phe₂₀ i Cys-A β ₁₀₋₂₅ statin Phe₂₀-Ala₂₁ i protutijela razvijenih na A β ₁₀₋₂₅ koja imaju reduciranu vezu između Phe₁₉ i Phe₂₀. Taj dokument spominje izdvajanje A β , ali to je spekulacija, jer izum ne daje dokaze da se to zaista i događa. Nadalje, dokument ne pruža dokaze *in vivo* da primjena protutijela uzrokuje uklanjanje A β iz centralnog živčanog sustava (CNS), interferira sa stvaranjem plakova, smanjuje broj plakova, stvara komplekse između protutijela i A β u uzorcima tkiva ili utječe na kogniciju.

Pokazano je da je jedan put metabolizma A β preko transporta iz CNS u plazmu (Zlokovic, B.V., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* (1996) 93:4229-4234; Ghersi-Egea, J-F., *et al.*, *J. Neurochem.* (1996) 67:880-883). Uz to, pokazano je da A β koji se nalazi u plazmi može prijeći barijeru između krvi i mozga i ući u mozak (Zlokovic, B.V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) 67:1034-1040). Također je prikazano da primjena određenih poliklonskih i monoklonskih protutijela na A β snižava odlaganje A β u amiloidnim plakovima u transgeničnim miševima APP^{V717F} koji su modeli za Alzheimerovu bolest (Bard, F., *et al.*, *Nature Med.* (2000) 6:916-919); no, rečeno je da se to dešava zahvaljujući tome što određena protutijela anti-A β prelaze barijeru između krvi i mozga stimulirajući time fagocitozu amiloidnih plakova mikroglijalnim stanicama. U pokusima Bard-a testiranja rezova mozga *ex vivo* pokazala su da je prisutnost dodanih protutijela A β , zajedno s egzogeno dodanim stanicama mikroglija, inducirala fagocitozu A β , rezultirajući u otklanjanju naslaga A β .

Razine topivog i A β ₄₀ i A β ₄₂ koji se nalaze u centralnom živčanom sustavu i krvi mogu biti detektirane korištenjem standardiziranih testova korištenjem protutijela usmjerenih na epitope duž lanca A β . Takvi su testovi prikazani, na primjer, u izumima U.S. 5,766,846; 5,837,672; i 5,593,846. Ti izumi opisuju stvaranje mišjih monoklonskih protutijela na centralne domene peptida A β , za koje je rečeno da imaju epitope oko, i uključujući, pozicije 16 i 17. Također su opisana i protutijela usmjerena na N-terminalnu regiju. Nakoliko je monoklonskih protutijela izdvojeno da reagira imunološki s pozicijama 13-28 peptida A β ; nisu se vezali na peptide koji predstavljaju pozicije 17-28, dakle, prema citiranim izumima, koji utvrđuju da je to ta regija, uključujući i pozicije 16-17 (dio koji predstavlja α -sekretazu), to je ciljani dio za ta protutijela. Među protutijelima za koje je poznato da se vežu između aminokiselina 13 i 28 peptida A β su mišja protutijela 266, 4G8 i 1C2.

Mi smo neočekivano pronašli da primjena protutijela 266 vrlo brzo i gotovo potpuno oporavlja kogniciju (sjećanje na predmete) kod hemizigotnih transgeničnih miševa (APP^{V717F}) starih 24 mjeseca. Ipak, protutijelo nema osobine koje su, prema onome što nas uči ovo područje znanosti, potrebne da bi protutijelo bilo učinkovito u liječenju Alzheimerove bolesti, Downovog sindroma i ostalih stanja vezanih uz peptid A β . Na naše daljnje iznenađenje, primijetili smo da su protutijela koja vežu A β između pozicija 13 i 28 (266 i 4G8) sposobna izdvojiti topive oblike A β iz njihove veze, oblika kojim cirkuliraju krvlju, i da periferna administracija protutijela 266 rezultira u brzom otjecanju relativno velikih količina peptida A β iz centralnog živčanog sustava u plazmu. Ti rezultati pokazuju drugačiji način odstranjivanja topivog A β , prevencije nastajanja plaka, i, što najviše iznenađuje, poboljšanje kognicije, čak bez toga da neophodno smanji broj amiloidnih plakova A β , prelazi barijeru između krvi i mozga u nekom većem obimu, nastanjuje plakove, aktivira stanične mehanizme, ili se veže na agregirane A β s velikim afinitetom.

Opis izuma

Izum pruža humanizirana protutijela, ili njihove odsječke, koja pozitivno djeluju na kogniciju u oboljenjima i stanjima u kojima može biti uključen A β , kao što su klinička i preklinička Alzheimerova bolest, Downov sindrom i klinička i preklinička cerebralna amiloidna angiopatija. Protutijela ili njihovi odsječci ne trebaju preći barijeru krv-mozak, dolaziti do amiloidnog plaka, aktivirati stanične odgovore, niti čak nužno reducirati opterećenje amiloidnim plakovima. U drugom aspektu, ovaj izum pruža humanizirana protutijela i njihove odsječke koji izdvajaju peptid A β iz njegovog vezanog oblika koji cirkulira krvlju i mijenjaju uklanjanje topivog i vezanog oblika A β iz centralnog živčanog sustava i plazme. U slijedećem aspektu, ovaj izum pruža humanizirana protutijela i njihove odsječke, gdje se humanizirana protutijela specifično vežu na epitop između aminokiselina 13 i 28 molekule A β . Nadalje, ovaj izum pruža protutijela i njihove odsječke, u kojima su CDR izvedeni iz mišjeg monoklonskog protutijela 266 i u kojem protutijela od prilike

zadržavaju svojstva vezanja mišjeg protutijela i imaju svojstva funkcionalno ekvivalentna onima mišjeg protutijela (slijedovi SEQ ID NO:1 do SEQ ID NO:6) *in vitro* i *in vivo*. Dalje, ovaj izum pruža humanizirana protutijela i njihove odsječke u kojima varijabilne regije imaju slijedove koji sadrže CDR iz mišjeg protutijela 266 i specifične okvirne slijedove čovjeka (slijedovi SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:10), u kojem protutijela od prilike zadržavaju svojstva vezanja mišjeg protutijela i imaju svojstva funkcionalno ekvivalentna mišjem protutijelu 266 *in vitro* i *in vivo*. U slijedećem aspektu, ovaj izum pruža humanizirana protutijela i njihove odsječke u kojima je laki lanac SEQ ID NO:11 a teški lanac je SEQ ID NO:12.

Također, dio su izuma i polinukleotidni slijedovi koji kodiraju humanizirana protutijela ili njihove odsječke gore opisane, vektore koji sadrže polinukleotidne slijedove koji kodiraju humanizirana protutijela ili njihove odsječke, stanice domaćine transformirane s vektorima ili koje u svom genomu sadrže polinukleotide koji eksprimiraju humanizirana protutijela ili njihove odsječke, farmaceutske formulacije humaniziranih protutijela i njihovih odsječaka i postupke njihovog pripravljanja i korištenja.

Takva humanizirana protutijela i njihovi odsječci korisna su za izdvajanje A β kod ljudi; za liječenje i preveniranje oboljenja i stanja okarakteriziranih plakovima A β ili toksičnošću A β u mozgu, kao što su Alzheimerova bolest, Downov sindrom i cerebralna amiloidna angiopatija kod ljudi; za dijagnosticiranje tih oboljenja u ljudi i za određivanje hoće li bolesnik reagirati na liječenje ljudskim protutijelima na A β .

Administracija odgovarajućeg humaniziranog protutijela *in vivo* radi izdvajanja peptida A β koji cirkulira u biološkim tekućinama korisna je za preventivno i terapijsko liječenje stanja povezanih sa stvaranjem difuznih, neuritskih i cerebrovaskularnih plakova u mozgu koji sadrže A β . Humanizirano protutijelo, uključujući njegov imunološki reaktivni odsječak, rezultira u uklanjanju peptida A β iz makromolekularnih kompleksa koji bi normalno bili relevantni za njegovo prenošenje u tjelesne tekućine, na i s mjesta gdje se mogu stvoriti plakovi ili gdje bi on mogao biti toksičan. Uz to, izdvajanje peptida A β iz plazme s protutijelom ili njegovim odsječkom ponaša se kao «odvod», učinkovito izdvajajući topivi peptid A β u odjeljku plazme, i potičući ulazak A β u plazmu s mjesta u centralnom živčanom sustavu (CNS). Izdvajanjem A β u krv, neto odvod iz mozga je pojačan i prevenirano je odlaganje topivog A β u netopive plakove i stvaranje toksičnih topivih oblika u mozgu. Dodatno, netopivi A β u plakovima koji je u ravnoteži s topivim A β može se ukloniti iz mozga preko učinka izdvajanja u krvi. Izdvajanje peptida A β protutijelom također pojačava njegovo uklanjanje iz tijela i inhibira toksične učinke topivog A β u mozgu i razvijanje, te daljnje akumuliranje, netopivog A β kao amiloida u plakovima. Protutijela korisna u ovom izumu ne prelaze barijeru krv-mozak u velikim količinama ($\leq 1\%$ razine u plazmi). Također, humanizirana protutijela korištena u ovom izumu, kada se daju periferno, ne trebaju izazvati stanični imunološki odgovor u mozgu kada se vežu za peptid A β ili kada slobodno cirkuliraju da bi izazvali svoje pozitivne učinke. Nadalje, nakon što su periferno administrirani, ne trebaju se primjetno vezati na agregirane peptide A β u mozgu da bi izazvali svoje pozitivne učinke.

Dakle, u jednom aspektu, ovaj izum je usmjeren na postupak liječenja i preveniranja stanja okarakteriziranih stvaranjem plakova koji sadrže protein beta-amiloid kod ljudi, koji se sastoji od davanja, po mogućnosti perifernog, učinkovite doze humaniziranog monoklonskog protutijela ili njegovog imunološki reaktivnog odsječaka, ljudima kojima je takovo liječenje, bilo terapijsko ili preventivno, potrebno, a koje se specifično veže na središnju regiju peptida A β . U drugom aspektu, ovaj je izum usmjeren na postupak inhibicije stvaranja amiloidnih plakova i uklanjanja amiloidnih plakova, koji se sastoji od davanja bolesnicima, kojima je takva inhibicija potrebna, učinkovite doze humaniziranog protutijela koje izdvađa peptid A β iz njegovog oblika koji cirkulira krvlju i inducira uklanjanje iz mozga, kao što mijenja i uklanjanje A β u plazmi i mozgu. U daljnjim aspektima, ovaj je izum usmjeren na ta humanizirana protutijela, uključujući i njihove imunološki učinkovite dijelove, i na postupke njihovog pripremanja.

Ovaj izum također uključuje postupke oporavka kognitivnog propadanja, poboljšanje kognicije, liječenje kognitivnog propadanja i preveniranje kognitivnog propadanja kod bolesnika kojima je dijagnosticirana klinička ili preklinička Alzheimerova bolest, Downov sindrom, ili klinička ili preklinička cerebralna amiloidna angiopatija, koje se sastoji od davanja bolesnicima učinkovite doze humaniziranog protutijela iz ovog izuma.

Ovaj izum također uključuje korištenje humaniziranog protutijela iz izuma za proizvodnju lijeka, uključujući i produženu ekspresiju rekombinantnih slijedova koji kodiraju za protutijelo ili odsječak protutijela u tkivima ljudi, za liječenje, preveniranje ili oporavak Alzheimerove bolesti, Downovog sindroma ili cerebralne amiloidne angiopatije; za liječenje, preveniranje ili oporavak kognitivnog propadanja u kliničkoj ili prekliničkoj Alzheimerovoj bolesti, Downovom sindromu ili kliničkoj ili prekliničkoj cerebralnoj amiloidnoj angiopatiji; ili za inhibiranje stvaranja amiloidnih plakova ili učinaka toksičnih topivih oblika A β kod ljudi.

Ovaj se izum odnosi na iznenađujuće opažanje da se unutar kratkog vremenskog razdoblja nakon administracije protutijela iz ovog izma relativno velike količine A β uklanjaju iz centralnog živčanog sustava u krv. Dakle, ovaj izum

uključuje postupke procjene reakcije bolesnika (ljudi) na liječenje protutijelom, ili njegovim odsječkom, koje se veže na A β , a koje se sastoji od: a) davanja protutijela ili njegovog odsječka bolesniku; i b) mjerenja koncentracije A β u krvi bolesnika.

5 Ovaj izum također uključuje postupak liječenja bolesnika (ljudi) protutijelom, ili njegovim odsječkom, koje se veže na A β , a sastoji se od: a) davanje prve doze protutijela ili njegovog odsječka bolesniku; b) unutar tri sata do dva tjedna nakon davanja prve doze, mjerenje koncentracije A β u krvi bolesnika; c) ako je potrebno, izračunavanje druge doze protutijela ili njegovog odsječka na temelju rezultata koraka b), koja je ista ili različita od prve doze; i d) davanje druge doze protutijela ili odsječka.

10 Ovaj izum također uključuje postupak procjene učinkovitosti protutijela, ili njegovog odsječka, koje se veže na A β kod bolesnika, na inhibiciju ili preveniranje stvaranja A β amiloidnih plakova, na reduciranje A β amiloidnih plakova, na reduciranje učinaka toksičnih topivih oblika A β , ili na liječenje stanja ili oboljenja povezanih s plakovima A β , koji se sastoji od: a) uzimanja prvog uzorka iz plazme ili CSF bolesnika; b) mjerenja bazične koncentracije A β u prvom uzorku; 15 c) davanja protutijela ili njegovog odsječka; d) unutar tri sata do dva tjedna nakon administracije protutijela ili njegovog odsječka, uzimanja drugog uzorka plazme ili CSF bolesnika; i e) mjerenja koncentracije A β u drugom uzorku; gdje je učinkovitost stavljena u odnos s količinom A β vezanog na protutijelo u krvi i koncentracije A β u CSF.

Kratki opis crteža

20 Slika 1 prikazuje postotak peptida A β uklonjenog pomoću Mab 266 iz ljudske cerebrospinalne tekućine kroz membranu za dijalizu kao funkciju veličine pora određene molekularne mase membrane za dijalizu.

Slika 2 prikazuje koncentraciju A β_{TOTAL} pronađenog u plazmi transgeničnih miševa APP^{V717F} nakon injiciranja s 200 μ g ili 600 μ g Mab 266 kao funkciju vremena.

25 Slika 3A prikazuje količinu naslaga peptida A β u kori mozga transgeničnih miševa APP^{V717F} obrađenih s fiziološkom otopinom, mišjim IgG, odnosno Mab 266.

Slika 3B prikazuje korelaciju tih rezultata s parentalnim porijeklom.

30 Slika 4 prikazuje polinukleotidne slijedove za ekspresiju lakog lanca humaniziranog 266 plazmida pVk-Hu266 i aminokiselinski slijed prikazan jednim slovom za eksprimirani laki lanac humaniziranog 266 (što, u zrelom obliku, odgovara SEQ ID NO:11).

Slika 5 prikazuje polinukleotidne slijedove za ekspresiju teškog lanca humaniziranog 266 plazmida pVg1-Hu266 i aminokiselinski slijed prikazan jednim slovom za ekspresiju teškog lanca humaniziranog 266 (što, u zrelom obliku, odgovara SEQ ID NO:12).

Slika 6 je mapa plazmida pVk-Hu266.

35 Slika 7 je mapa plazmida pVg1-Hu266.

Načini izvođenja izuma

40 Peptidi A β koji cirkuliraju ljudskim biološkim tekućinama predstavljaju karboksi regiju prekursorskog proteina koji je kodiran na kromosomu 21. Ranije su objavljeni rezultati pokusa *in vitro* da je peptid A β slabo topiv u fiziološkim otopinama, budući da posjeduje lanac hidrofobnih aminokiselina koje su dio regije koja je pripojena na svoj duži prekursor na lipidnoj staničnoj membrani. Stoga nije iznenađujuće da je cirkulirajući peptid A β obično u kompleksu s drugim molekulama koji ga sprečavaju da stvara agregate. To je rezultiralo u poteškoćama u detektiranju cirkulirajućeg peptida A β u biološkim tekućinama.

45 Gore spomenuti dokumenti izuma (U.S. izumi 5,766,846; 5,837,672 i 5,593,846) opisuju pripremanje protutijela, uključujući i monoklonska protutijela, pod nazivom klon 266 koja su bila razvijena na, i pokazano je da se specifično vežu na, peptid koji se sastoji od aminokiselina 13-28 peptida A β . Aplikanti ovog izuma pronašli su da su protutijela koja se vežu unutar te regije, za razliku od protutijela koja se vežu drugdje na aminokiselinski slijed A β , sposobna vrlo 50 učinkovito izdvojiti topivi peptid A β iz makromolekularnih kompleksa. To izdvajanje ima učinak na neto uklanjanje peptida A β iz CNS, mijenja njegovo uklanjanje iz CNS i plazme i smanjuje njegovu sposobnost stvaranja plakova. Dakle, protutijela te specifičnosti, modificirana tako da im se smanji imnogenost modificiranjem u humanizirani oblik, pružaju mogućnost za liječenje, preventivno i terapijsko, stanja povezanih sa stvaranjem beta-amiloidnih plakova. Ta stanja uključuju, kao što je gore navedeno, prekliničku i kliničku Alzheimerovu bolest, Downov sindrom, i prekliničku i 55 kliničku cerebralnu amiloidnu angiopatiju.

Onako kako je korištena u ovom izumu, riječ «liječenje» uključuje terapijsko liječenje, u kojem se već zna da je stanje koje se treba liječiti prisutno i prophylaxis – npr. prevencija, ili poboljšanje, mogućeg budućeg nastanka stanja.

Pojmom «monoklonska protutijela koja se vežu za središnji dio peptida A β » označavaju se monoklonska protutijela (Mab ili Mabs) koja se vežu za aminokiselinski slijed koji predstavlja epitop, koji se nalazi između pozicija 13-28 peptida A β . Ne treba biti ciljane cijela regija. Dok god se protutijelo veže barem za epitop unutar te regije (posebice, npr., uključujući mjesto α -sekretaze 16-17 ili mjesto na koje se veže protutijelo 266), takva su protutijela učinkovita u postupku iz ovog izuma.

Pojam «protutijelo» označava monoklonsko protutijelo *per se*, ili njegov imunološki učinkovit odsječak, poput Fab, Fab' ili njegov odsječak F(ab')₂. U nekim kontekstima u ovom izumu odsječci će biti spomenuti kao posebno naglašeni; ipak, podrazumijevat će se da će, bez obzira jesu li odsječci specifičirani, pojam «protutijelo» uključivati takve odsječke kao i jednolančane oblike. Dok god protein zadržava sposobnost specifičnog vezanja za njemu namijenjen cilj, i u ovom slučaju, da izdvaja peptid A β od njegovih proteina nosača u krvi, on je uključen u pojam «protutijelo». Uutar definicije «protutijela» također su uključeni, na primjer, jednolančani oblici, općenito označeni kao regije Fv, protutijela s tom specifičnošću. Po mogućnosti, no ne neophodno, protutijela korisna za ovaj izum proizvode se rekombinacijom, budući da je potrebna manipulacija u pravilu mišjih, ili drugih ne-ljudskih protutijela, s prikladnom specifičnošću da bi ih se preobličilo u humanizirani oblik. Protutijela mogu ili ne moraju biti glikozilirana, iako se preferiraju glikozilirana protutijela. Protutijela su međusobno na pravi način povezana disulfidnim vezama, kao što je dobro poznato.

Poznato je da je bazična strukturna jedinica protutijela sačinjena od tetramera. Svaki tetramer se sastoji od dva identična para polipeptidnih lanaca, od kojih se svaki par sastoji od jednog «lakog» (oko 25 kDa) i jednog «teškog» (oko 50-70 kDa) lanca. Amino-terminalni dio svakog lanca uključuje varijabilnu regiju od oko 100 do 110 ili više aminokiselina primarno odgovornih za prepoznavanje antigena. Karboksi-terminalni dio svakog lanca definira nepromjenjivu regiju primarno odgovornu za funkciju efektor.

Laki lanci se klasificiraju kao gamma, mu, alpha, i lambda. Teški su lanci klasificirani kao gamma, mu, alpha, delta ili epsilon i definiraju izotip protutijela kao IgG, IgM, IgA, IgD i IgE, svaki. Unutar lakih i teških lanaca, varijabine i nepromjenjive regije su povezane regijom «J» od oko 12 ili više aminokiselina, s teškim lancem koji također uključuje regiju «D» od oko 10 ili više aminokiselina.

Varijabilne regije svakog, lakog/teškog para lanaca, čine vežuće mjesto protutijela. Dakle, intaktno protutijelo posjeduje dva mjesta vezanja. Svi lanci imaju istu opću strukturu koja se sastoji od relativno konzerviranih okvirnih regija (FR; framework regions) povezanih s tri hipervarijabilne regije, također poznate pod nazivom regije određivanja komplementarnosti ili CDRs (complementarity determining regions). CDRs s dva lanca svakog para okružene su okvirnim regijama, omogućujući vezanje za specifični epitop. Od N-kraja do C-kraja, i laki i teški lanci sadrže domene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 i FR4. Pridruživanje aminokiselina svakoj regiji je u skladu s dobro poznatim konvencijama [Kabat «Sequences of Proteins of Immunological Interest» National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 i 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989)].

Kao što je dobro poznato u ovom području, monoklonska protutijela se spremno mogu pripremiti s prikladnom specifičnošću standardnim tehnikama imunizacije sisavaca, stvarajući hibridome stanica koje stvaraju protutijelo spomenutih sisavaca ili imortalizacijom stanica i kultiviranjem hibridoma ili imuniziranih stanica da bi ih se procijenilo za prikladnu specifičnost. U ovom slučaju takva protutijela mogu se dobiti imuniziranjem ljudskih, zečjih, štakorskih ili mišjih stanica, na primjer, s peptidom koji predstavlja epitop koji sadrži regiju 13-28 peptida A β ili njegovom prikladnom podregijom. Materijali za rekombinantnu manipulaciju mogu se dobiti i izoliranjem nukleotidnog slijeda koji kodira za željeno protutijelo iz hibridoma ili drugih stanica koje ga proizvode. Ti se nukleotidni slijedovi zatim mogu manipulirati da bi se dobio njihov humanizirani oblik.

Pojmom «humanizirano protutijelo» označava se protutijelo koje se sastoji djelomično ili u potpunosti od aminokiselinskog slijeda dobivenog iz matične linije ljudskog protutijela kojem je promijenjen slijed protutijela s ne-ljudskim regijama determiniranja komplementarnosti (CDR). Najjednostavnija takva promjena može se sastojati od jednostavne supstitucije nepromjenjive regije ljudskog protutijela sa nepromjenjivom regijom miša, koja rezultira u ljudskoj/mišjoj kimeri koja može imati dovoljno nisku imunogenost da bi bila prihvatljiva za farmaceutsku uporabu. Preferirano je varijabilna regija protutijela, i čak CDRs, također humanizirana tehnikama koje su dobro poznate stručnjacima iz područja. Okvirne regije varijabilnih regija supstituirane su odgovarajućim ljudskim okvirnim regijama ostavljajući ne-ljudske CDRs znatno netaknutima, ili čak zamjenjene CDR sa slijedovima dobivenih iz ljudskog genoma. Potpuna ljudska protutijela dobivena su u genetski modificiranim miševima čiji je imunološki sustav izmijenjen da bi odgovarao ljudskom imunološkom sustavu. Kao što je gore spomenuto, za korištenje postupka iz ovog izuma dovoljno je koristiti imunološki specifične odsječke protutijela, uključujući odsječke koji predstavljaju jednolančane oblike.

Humanizirano protutijelo, ponovno, se odnosi na protutijelo koje sadrži ljudski okvir, barem jednu CDR iz ne-ljudskog protutijela, i u kojem je bilo koja prisutna nepromjenjiva regija znatno identična ljudskoj nepromjenjivoj regiji

imunoglobulina, npr., barem oko 85-90% preferirano barem 95% identična. Stoga, svi dijelovi humaniziranog protutijela, osim moguće CDRs, znatno su identični odgovarajućim dijelovima jednog ili više slijedova nativnog ljudskog imunoglobulina. Na primjer, humanizirani imunoglobulin u pravilu ne bi obuhvaćao kimerno protutijelo s mišjom varijabilnom regijom/ljudskom nepromjenjivom regijom.

Humanizirana protutijela imaju barem tri potencijalne prednosti pred ne-ljudskim i kimernim protutijelima za korištenje u liječenju ljudi:

Budući da je dio efektor ljudski, može bolje reagirati s drugim dijelovima ljudskog imunološkog sustava (npr. uništiti ciljane stanice učinkovitije komplement-ovisnom citotoksičnošću (CDC) ili protutijelo-ovisnom staničnom citotoksičnošću (ADCC).

Ljudski imunološki sustav ne bi trebao prepoznati okvirnu ili C-regiju humaniziranog protutijela kao stranu, i time bi odgovor protutijela protiv takvog injiciranog protutijela trebao biti niži nego protiv potpuno stranog ne-ljudskog protutijela ili djelomično stranog kimernog protutijela.

Objavljeno je da injicirana ne-ljudska protutijela imaju puno kraću dužinu poluživota u ljudskoj cirkulaciji od poluživota ljudskih protutijela. Injicirana humanizirana protutijela imaju veću dužinu poluživota bazično jednaku ljudskim protutijelima koja su prirodno prisutna u cirkulaciji, omogućujući davanje manjih doza, rjeđe.

Dizajn humaniziranih protutijela može se izvoditi na slijedeći način. Kada aminokiseline spadaju pod slijedeću kategoriju, aminokiselina okvira ljudskog imunoglobulina koje se koristi (imunoglobulin primatelj) se zamjenjuje aminokiselinom okvira iz ne-ljudskog imunoglobulina koji daje CDR (imunoglobulin primatelj):

- aminokiselina u ljudskoj okvirnoj regiji imunoglobulina primatelja nije uobičajena za ljudski imunoglobulin na toj poziciji, dok je odgovarajuća aminokiselina u imunoglobulinu davatelju tipična za ljudski imunoglobulin na toj poziciji;

- pozicija aminokiseline je neposredno ispred one u CDRs; ili
- bilo koji atom pokrajnjeg lanca aminokiseline iz okvirne regije je unutar oko 5-6 angstrema (centar do centra) od bilo kojeg atoma aminokiseline u CDR u trodimenzionalnom modelu imunoglobulina [Queen, *et al.*, op. cit., i Co, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991)]. Kada svaka od aminokiselina u ljudskoj okvirnoj regiji imunoglobulina primatelja i odgovarajuća aminokiselina u imunoglobulinu davatelju nije uobičajena za ljudski imunoglobulin na toj poziciji, takva aminokiselina se zamjenjuje s aminokiselinom karakterističnom za ljudski imunoglobulin na toj poziciji.

Poželjno ljudsko protutijelo je humanizirani oblik mišjeg protutijela 266. CDRs humaniziranog 266 imaju slijedeće aminokiselinske slijedove:

CDR1 lakog lanca:

```

1           5           10           15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID NO:1)

```

CDR2 lakog lanca:

```

1           5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2)

```

CDR3 lakog lanca:

```

1           5
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO:3)

```

CDR1 teškog lanca:

```

1           5
Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)

```

CDR2 teškog lanca:

```

1           5           10           15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly (SEQ
ID NO:5)

```

i CDR3 teškog lanca:

1

Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).

Preferirana varijabilna regija lakog lanca humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed, u kojem je okvirna regija porijeklom iz ljudske matične linije Vk segmenti DPK18 i J segment Jk1, s nekoliko supstituiranih aminokiselina u koncenzus aminokiselinama iste ljudske podskupine V da bi se smanjio imunogeni potencijal:

```

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

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa

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

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

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val

           95          100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa

          110
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)

```

10 u kojem:

Xaa na poziciji 2 je Val ili Ile;

Xaa na poziciji 7 je Ser ili Thr;

Xaa na poziciji 14 je Thr ili Ser;

Xaa na poziciji 15 je Leu ili Pro;

15 Xaa na poziciji 30 je Ile ili Val;

Xaa na poziciji 50 je Arg, Gln ili Lys;

Xaa na poziciji 88 je Val ili Leu;

Xaa na poziciji 105 je Gln ili Gly;

Xaa na poziciji 108 je Lys ili Arg;

20 Xaa na poziciji 109 je Val ili Leu;

Preferirana varijabilna regija teškog lanca humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed, u kojem je okvirna regija porijeklom iz ljudske matične linije VH segmenti DP53 i J segment JH4, s nekoliko supstituiranih aminokiselina u istoj ljudskog podskupini da bi se reducirano imunogeni potencijal:

25

```

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

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

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

           50           55           60
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr

           65           70           75
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa

           80           85           90
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp

           95          100          105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

          110
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
(SEQ ID NO:8)

```

u kojem:

- 5 Xaa na poziciji 1 je Glu ili Gln;
Xaa na poziciji 7 je Ser ili Leu;
Xaa na poziciji 46 je Glu, Val, Asp ili Ser;
Xaa na poziciji 63 je Thr ili Ser;
Xaa na poziciji 75 je Ala, Ser, Val ili Thr;
10 Xaa na poziciji 76 je Lys ili Arg;
Xaa na poziciji 89 je Glu ili Asp; i
Xaa na poziciji 107 je Leu ili Thr.

- 15 Posebice preferirana varijabilna regija lakog lanca humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed, u kojem je okvirna regija porijeklom iz ljudske matične linije Vk segmenata DPK18 i J segmenta Jk1, s nekoliko aminokiselinskih supstitucija u konsenzus aminokiselinama iste ljudske podskupine V da bi se smanjio imunogeni potencijal:

```

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

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

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

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

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95          100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

          110
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
(SEQ ID NO:9).

```

Posebice preferirana varijabilna regija teškog lanca humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed, u kojem je okvirna regija porijeklom iz ljudske matične linije VH segmenata DP53 i segmenta JH4:

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

(SEQ ID NO:10)

5

Preferirani laki lanac humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed:

```

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

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

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

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

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95          100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

          110          115          120
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

          125          130          135
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

          140          145          150
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

          155          160          165
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

          170          175          180
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

          185          190          195
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

          200          205          210
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

          215
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

(SEQ ID NO:11).

Preferirani teški lanac humaniziranog protutijela iz ovog izuma ima slijedeći aminokiselinski slijed:

HR P20080430 B1

1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
	20	25	30
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
	35	40	45
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	50	55	60
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr			
	65	70	75
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
	80	85	90
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
	95	100	105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	110	115	120
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	125	130	135
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	140	145	150
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
	155	160	165
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
	170	175	180
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
	185	190	195
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
	200	205	210
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
	215	220	225
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	230	235	240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	245	250	255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
	275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
	305	310	315
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			

Drugi su slijedovi mogući za laki i teški lanac hmaniziranog protutijela iz ovog izuma i za humanizirano protutijelo 266. Imnoglobulini mogu imati dva para, kompleksa lakih/teških lanaca, od kojih barem jedan lanac ima jednu ili više regija determinacije komplementarnosti iz miša koje su funkcionalno vezane za segmente ljudskih okvirnih regija.

5 U drugom aspektu, ovaj je izum usmjeren na rekombinantne polinukleotide koji kodiraju protutijela koja, kada su eksprimirana, sadrže CDR teškog i lakog lanca protutijela iz ovog izuma. Kao i za ljudsku okvirnu regiju, aminokiselinski slijed okvirne ili varijabilne regije ne-ljudskog imunoglobulina koji daje CDR se uspoređuje s odgovarajućim slijedovima varijabilnih regija ljudskog imunoglobulina i izabire se slijed koji ima visoki postotak identičnih aminokiselina. Primjeri polinukleotida, koji u kodu eksprimiraju polipeptidni lanac koji sadrži CDRs teškog i
10 lakog lanca monoklonskog protutijela 266 prikazani su na slikama 4 i 5. Zbog degeneracije koda i nekritičnih aminokiselinskih supstitucija, drugi polinukleotidni slijedovi mogu se spremno zamijeniti tim slijedovima. Posebno preferirani polinukleotidi iz ovog izuma kodiraju protutijela, koja kada su eksprimirana, sadrže CDRs slijedova SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:6, ili bilo koju od varijabilnih regija SEQ ID NO:7 – SEQ ID NO:10, ili laki i teški lanac SEQ ID NO:11 i SEQ ID NO:12.

15 Polinukleotidi će u pravilu ubuduće uključivati polinukleotidni slijed koji kontrolira ekspresiju, koji će biti vezan na slijedove koji kodiraju humanizirani imunoglobulin, uključujući heterologne regije promotora koji prirodno postoje. Preferirano, slijedovi kontrole ekspresije bit će sustavi eukariotskih promotora u vektorima koji su sposobni transformirati ili transficirati eukariotske stanice domaćina, ali također se mogu koristiti i kontrolni slijedovi za prokariotske domaćine. Jednom kada je vektor inkorporiran u priklanu staničnu liniju, stanica domaćin se umnaža pod
20 uvjetima prikladnim za visoku razinu ekspresiju nukleotidnih slijedova i, ako je poželjno, za sakupljanje i pročišćavanje lakih lanaca, teških lanaca, dimera laki/teški lanac ili intaktnih protutijela, vežućih odsječaka ili drugih oblika imunoglobulina može slijediti.

25 Nukleotidni slijedovi iz ovog izuma koji su sposobni na kraju eksprimirati željena humanizirana protutijela mogu se formirati iz mnogih različitih polinukleotida (genomska ili cDNA, RNA, sintetski oligonukleotidi, itd.) i komponenata (npr. V, J, D i C regija), kao i mnogim različitim tehnikama. Spajanje odgovarajućih genomskih i sintetskih slijedova uobičajen je postupak produciranja, ali također se mogu koristiti slijedovi cDNA.

30 Slijedovi DNA ljudske nepromjenjive regije mogu se izolirati u skladu s dobro poznatim procedurama iz različitih ljudski stanica, ali preferirano iz immortaliziranih B-stanica. CDR za produciranje imunoglobulina iz ovog izuma bit će na sličan način izvedene iz ne-ljudskih monoklonskih protutijela sposobnih za vezanje na epitop između aminokiselina 13 i 28 peptida A β , koja su producirana u bilo kojem prikladnom izvoru sisavaca, uključujući miševе, štakore, zečeve ili druge kraljevnjake koji su sposobni producirati protutijela dobro poznatim postupcima, kao što je gore opisano.
35 Prikladan izvor stanica za polinukleotidne slijedove i stanice domaćine za ekspresiju mnogoglobulina i sekreciju mogu se dobiti iz brojnih izvora dobro poznatim stručnjacima iz područja.

Uz humanizirane imunoglobuline specifično opisane u ovom izumu, mogu se odrediti i proizvesti i drugi «znatno homologni» modificirani imunoglobulini korištenjem različitih tehnika rekombinantne DNA dobro poznatih
40 stručnjacima iz područja. Na primjer, okvirne se regije mogu razlikovati od nativnih slijedova na razini primarne strukture zamjenom nekoliko aminokiselina, terminalnom i središnjom adicijom ili delecijom, i slično. Nadalje, različite ljudske okvirne regije mogu se koristiti same ili u kombinaciji kao baza za humanizirana protutijela iz ovog izuma. Općenito, modifikacije gena mogu se postići različitim dobro poznatim tehnikama, poput mutageneze specifičnog mjesta (site-directed mutagenesis).

45 Prema izboru, mogu se proizvesti odsječci polipeptida koji sadrže samo dio primarne strukture protutijela, koji sadrže jednu ili više aktivnosti imunoglobulina (npr. aktivnost vezanja komplementa). Ti odsječci polipeptida mogu se proizvesti proteolitičkim cijepanjem intaktnih protutijela postupkom dobro poznatim u području, ili insertiranjem stop kodona na željenim mjestima u vektoru korištenjem mutageneze specifičnog mjesta, poput toga da se od CH1 dobiju
50 odsječci Fab ili od regije hing da se dobiju odsječci F(ab')₂. Jednolančana protutijela mogu se proizvesti spajanjem VL i VH spojinom DNA.

Kao što je ranije rečeno, kodirajući nukleotidni slijedovi bit će eksprimirani u domaćinima nakon što su slijedovi vezani (npr. pozicionirani da osiguraju funkcioniranje) za slijedove koji kontroliraju ekspresiju. Ti ekspresijski vektori u pravilu
55 se mogu replicirati u organizmima domaćinima bilo kao episomi ili kao integralni dijelovi domaćinske genomske DNA. Uobičajeno, ekspresijski će vektori sadržavati selekcijske biljege, npr. tetraciklin ili neomicin, da bi bila omogućena detekcija onih stanica koje su transformirane sa željenim slijedovima DNA.

60 *E. coli* je prokariotski domaćin koristan posebice za kloniranje polinukleotida iz ovog izuma. Drugi mikrobi domaćini prikladni za korištenje uključuju bacile poput *Bacillus subtilis*, i druge enterobacteriaceae, poput *Salmonella*, *Serratia* i

različite vrste *Pseudomonas*. U tim prokariotskim domaćinima, također se mogu napraviti ekspresijski vektori koji će u pravilu sadržavati slijedove kontrole ekspresije kompatibilne sa stanicama domaćinima (npr. izvorište replikacije). Dodatno, bilo koji broj dobro poznatih promotora može biti prisutan, poput sustava promotora laktoze, sustav promotora triptofana (*trp*), sustav promotora beta-laktamaze, ili sustav promotora iz faga lambda. Promotori će u pravilu kontrolirati ekspresiju, po mogućnosti sa operatorskim slijedom, i imaju slijedove vežućeg mjesta za ribosome i slična, za započinjanje i završavanje transkripcije i translacije.

Drugi mikrobi, poput gljivica, mogu se također koristiti za ekspresiju. *Saccharomyces* je preferirani domaćin, s prikladnim vektorima koji imaju slijedove kontrole ekspresije, poput promotora, uključujući 3-fosfoglicerat kinaze ili drugih glikolitičkih enzima, i izvorišta replikacije, terminirajućih slijedova i sličnih po želji.

Uz mikroorganizme, stanične kulture tkiva sisavaca mogu se također koristiti za ekspresiju i proizvodnju polipeptida iz ovog izuma. Eukariotske stanice su zapravo poželjne, jer je broj prikladnih staničnih linija domaćina sposobnih za sekreciju intaktnih imunoglobulina razvijen u području, i uključuju stanične linije CHO, različite stanične linije COS, stanične linije jajnika sirijskog hrčka, stanice HeLa, poželjno stanične linije mijeloma, transformirane B-stanice, stanične linije bubrega embrija čovjeka, ili hibridomi. Ekspresijski vektori za te stanice mogu uključivati slijedove kontrole ekspresije, poput izvorišta replikacije, promotora, pojačivača i potrebnih mjesta procesiranja informacije, poput vežućeg mjesta ribosoma, mjesta izrezivanja RNA, poliadencilacijskih mjesta, i slijedova terminacije transkripcije. Poželjni slijedovi kontrole ekspresije su promotori izvedeni iz gena imunoglobulina, SV40, adenovirusa, papiloma virusa goveda, citomegalovirusa i sličnih.

Vektori koji sadrže nukleotidne slijedove od interesa (npr. slijedovi koji kodiraju za teške i lake lance i slijedove kontrole ekspresije) mogu se unijeti u stanice domaćina dobro poznatim postupcima, koji variraju ovisno o tipu stanica domaćina. Na primjer, transfekcija pomoću kalcijevog klorida obično se koristi za prokariotske stanice, dok se obrada kalcijevim fosfatom ili elektroporacija može koristiti za druge stanice domaćine.

Jednom ekspimirana, cijela protutijela, njihovi dimeri, individualni laki i teški lanci, ili drugi oblici imunoglobulina iz ovog izma, mogu se pročititi prema standardnim procedurama iz područja, uključujući precipitaciju amonijevim sulfatom, ionskom izmjenom, afinitetom, reverznom fazom, kromatografijom kolonama s hidrofobnom interakcijom, gel elektroforezom i drugima. Znatno čisti imunoglobulini od barem oko 90 do 95% homogenosti su poželjni, i 98 do 99% ili više homogenosti je najpoželjnije za farmaceutsko korištenje. Jednom pročišćeni, djelomično ili do željene homogenosti, polipeptidi se zatim mogu koristiti terapijski ili preventivno, kao što je ovdje rečeno.

Protutijela (uključujući imunološki reaktivne odsječke) se daju bolesnicima koji imaju rizik pokazivanja simptoma povezanih s A β ili patologije poput kliničke ili prekliničke Alzheimerove bolesti, Downovog sindroma i kliničke ili prekliničke cerebralne amiloidne angiopatije, korištenjem standardnih tehnika administracije, poželjno periferno (npr. ne administracijom u centralni živčani sustav) u venu, u trbušnu šupljinu, pod kožu, u pluća, kroz kožu, u mišić, kroz nos, u usnu šupljinu, pod jezik ili administracijom supozitorija. Iako se protutijela mogu davati direktno u ventrikularni sustav, spinalnu tekućinu ili parenhim mozga, i tehnike za dolazak do tih lokacija su dobro poznate u području, nije nužno koristiti te kompliciranije procedure. Protutijela iz ovog izma su učinkovita kada se daju jednostavnijim tehnikama koje se oslanjaju na periferni sustav cirkulacije. Prednosti ovog izma uključuju sposobnost protutijela da proizvode svoje dobre učinke čak iako nisu data direktno u sami centralni živčani sustav. Zaista, ovdje je pokazano da je količina protutijela koja prelazi barijeru krv-mozak <0,1% njegove razine u plazmi i da protutijela iz izuma pokazuju sposobnost izdvajanja A β iz periferne cirkulacije kao što i mijenjaju odvod A β iz CNS i plazme.

Farmaceutske kompozicije za administraciju su dizajnirane da budu prikladne za izabrane načine administracije, i farmaceutski prihvatljivi ekscipijenti poput dispergirajućih agensa, pufera, surfaktanata, prezervativa, otapajućih agensa, izotoničnih agensa, stabilizirajućih agensa i sličnih su korišteni kako je prikladno. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, zadnje izdanje, uključeno ovdje kao referenca, pruža sažet prikaz formulacijskih tehnika koje su općenito poznate onima u praksi. Od posebne važnosti može biti promjena karakteristika topivosti protutijela iz ovog izuma, praveći ih više lipofilnima, na primjer, inkapsuliranjem protutijela u liposome ili blokiranjem polarnih skupina.

Poželjna je periferna sistemska administracija injekcijama u venu ili u trbušnu šupljinu ili pod kožu. Prikladne sprave za takve injekcije su jednostavne. Dodatno, administracija se također može izvoditi kroz mukozne membrane pomoću nazalnih aerosola ili supozitorija. Prikladne formulacije za takve načine administracije su dobro poznate i u pravilu uključuju surfaktante koji olakšavaju prelaz kroz membranu. Takvi surfaktanti su često izvedeni iz steroida ili su kationski lipidi poput N-[1-(2,3-dioleoil)propyl]-N,N,N-trimetilamonijklorid (DOTMA) ili različiti spojevi poput kolesterol-hemisukcinata, fosfatidil-glicerola i sličnih.

Koncentracija humaniziranog protutijela u formulacijama od niske kao oko 0,1% do tolike od 15 do 20% težine bit će izabrana primarno bazirno na volumenima tekućine, viskozitetu i tako dalje, u skladu sa specifičnim načinom administracije koji je izabran. Dakle, tipična farmaceutska kompozicija za injekciju trebala bi biti sačinjena da sadrži 1 mL sterilne puferirane vode ili PBS i 1-100 mg humaniziranog protutijela iz ovog izuma. Formulacija bi mogla biti sterilizirana filtracijom nakon spravljanja formulacije, ili na drugi način napravljena da je mikrobiološki prihvatljiva. Tipična kompozicija za intravenoznu infuziju mogla bi imati volumen od 250 mL tekućine poput sterilnog Ringerove otopine i 1-100 mg po mL, ili višu koncentraciju protutijela. Terapeutske agense iz ovog izuma mogu se zamrznuti ili liofilizirati za pohranjivanje i rekonstituirati u topivom sterilnom nosaču prije uporabe. Liofilizacija i rekonstitucija mogu voditi do različitih stupnjeva gubitka aktivnosti protutijela (npr. s konvencionalnim imunoglobulinima, protutijela IgM teže tome da imaju veći gubitak aktivnosti od protutijela IgG). Moguće je da se doze moraju prilagoditi tome da kompenziraju taj gubitak. pH formulacije će biti izabran da uravnoteži stabilnost protutijela (kemijski i fizički) i pruži ugodu bolesniku kojem su administrirana. Općenito, tolerira se pH između 4 i 8.

Iako se prethodni postupci uz prikladnu adaptaciju čine najzgodnijim i najprikladnijim za primjenu proteina poput humaniziranih protutijela, druge tehnike administracije, poput transdermalne administracije i oralne administracije, mogu se koristiti u slučaju da je dizajnirana za njih prikladna formulacija.

Dodatno, može biti poželjno da se koristi kontrolirano otpuštanje formulacije pomoću biodegenerabilnih filmova i matrica, ili osmotskih mini-pumpi, ili sustava dostave baziranih na kuglicama dekstrana, alginata ili kolagena.

Sažeto, formulacije su raspoložive za administriranje protutijela iz ovog izuma i vrlo su dobro poznate u ovom području, te mogu biti izabrane između različitih mogućnosti.

Tipične razine doze mogu se optimizirati korištenjem standardnih kliničkih tehnika i ovisit će o načinu administracije i stanja bolesnika.

Slijedeći primjeri su namijenjeni tome da ilustriraju ovaj izum, ali ga ne limitiraju na to.

Primjeri ovdje niže navedeni, između ostalih, mišja monoklonska protutijela označena kao «266» koja su originalno spravljena imuniziranjem s peptidom sastavljenim od aminokiselina 13-28 ljudskog peptida A β . Potvrđeno je da protutijelo imunoreagira s tim peptidom, ali je ranije objavljeno da ne reagira s peptidom koji sadrži samo aminokiseline 17-28 ljudskog peptida A β , ili s bilo kojim drugim epitopom unutar peptida A β . Pripremanje tog protutijela opisano je u U.S. izumu 5,766,846, uključen ovdje u obliku reference. Kao primjeri ovdje opisuju pokuse izvedene u mišjim sustavima, i korištenje mišjih monoklonskih protutijela je zadovoljavajuće. No, u postupcima liječenja iz ovog izuma koji su namijenjeni za liječenje ljudi, poželjni su humanizirani oblici protutijela s imunospecifičnošću koja odgovara onoj protutijela 266.

Primjer 1

Izdvajanje peptida A β dodanog u ljudske tekućine

Uzorci cerebrospinalne tekućine (CSF) čovjeka (50 μ l) i plazme čovjeka (50 μ l) inkubirani su 1 sat pri sobnoj temperaturi na slijedeći način:

same tekućine;

zajedno s 5 ng peptida A β ₄₀; ili

s 5 ng peptida A β ₄₀ i 1 mg monoklonskog protutijela 266 (opisanog, na primjer u izumu U.S. 5,766, 846 uključenog ovdje u obliku reference)

Uzorci su zatim stavljeni na elektroforezu u 4-25%-tnom nadenaturirajućem gelu s gradijentom, tzv. nadenaturirajuća gradijent gel elektroforeza (NDGGE) i prebačeni na nitroceluloznu membranu. Proteini su zatim obojeni s Ponceau S ili, za Western hibridizaciju, hibridizirani s monoklonskim protutijelom (3D6) obilježenim biotinom, specifičnim za prvih pet aminokiselina peptida A β , detektiranim s peroksidazom iz hrena vezanom na streptavidin te pojačanom kemiluminiscencijom (ECL; enhanced chemiluminescence). Hidratizirani dijagrami materijala koji se nalazio u linijama na membranama procijenjeni su korištenjem biljega molekularne težine tvrtke Pharmacia. Dakle, ako je peptid A β vezan za druge molekule, kretao bi se brzinom biljega veličine rezultirajućeg kompleksa.

Western hibridizacija CSF, bilo sa ili bez 5 ng peptida A β , ne pokazuje prisustvo peptida A β detekcijom protutijelom 3D6. Slični su rezultati dobiveni analizom ljudske plazme. To se pokazalo istinitim unatoč činjenici da se peptid A β može detektirati postupkom SDS-PAGE nakon čega slijedi Western hibridizacija korištenjem iste tehnike i na istim uzorcima CSF. Pretpostavljamo da je detekcija peptida A β bila onemogućena interakcijama između tog peptida i drugih faktora u testiranim tekućinama. No, kada smo u smjesu koja se inkubirala dodali Mab 266 karakteristične linije, koje

predstavljaju izdvojeni peptid A β u kompleksu s protutijelom, prisutne su i u plazmi i u CSF. Glavna linija je na od prilike hidriranom dijametru od 11 nm i odgovara monomeru protutijela s dodatnom manjom linijom na 13 nm koja odgovara dimeru protutijela.

5 Primjer 2

Specifičnost izdvojenog protutijela

Koristili smo uzorke koji su sadržavali 50 μ l ljudskog CSF ili 10 μ l CSF iz APP^{V717F}. APP^{V717F} su transgenični miševi koji predstavljaju mišji model Alzheimerove bolesti u kojima je eksprimiran transgen amiloidnog prekursorskog proteina koji posjeduje mutaciju obiteljske Alzheimerove bolesti što rezultira u produkciji ljudskog peptida A β u centralnom živčanom sustavu.

Uzorke smo inkubirali sa ili bez različitih Mabs (1 μ g) 1 sat pri sobnoj temperaturi, a zatim pušteni na elektroforezi u 4-25% NDGGE te hibridizirani na nitroceluloznoj membrani, kao što je opisano u Primjeru 1. Korištena su slijedeća protutijela:

- Mab 266 (koje se veže na pozicije 13-28);
- Mab 4G8 (koje se veže na pozicije 17-24);
- QCBpan (poliklonsko protutijelo iz zeca za pozicije 1-40);
- mišji IgG (nespecifično);
- Mab 3D6 (veže se na pozicije 1-5)
- Mab 21F12 (veže se na pozicije 33-42);
- Mab 6E10 (veže se na pozicije 1-17); i
- QCB_{40,42} (poliklonsko protutijelo iz zeca na A β ₄₀ i A β ₄₂).

Detekcija kompleksa peptida A β s protutijelom opisana je u Primjeru 1 – biotinom obilježenim protutijelom 3D6 (na N-terminalni kraj peptida A β) nakon čega je slijedila hibridizacija sa streptavidin-HRP i detekcija s ECL. Slično je detektirano u ljudskoj CSF ikubiranoj s Mab 266, u nekim slučajevima zamijenjenom s QCB_{40,42}, koje se veže na kraboksilni kraj peptida A β , za 3D6.

Rezultati su pokazali da od svih protutijela, samo Mab 4G8 i Mab 266 omogućuju detekciju peptida A β .

Rezultati su pokazali da, u slučaju ljudske CSF, se samo pomoću Mab266 i Mab 4G8 može izdvojiti, u količinama koje se mogu detektirati, kompleks protutijela i A β (ponovno, bez protutijela, A β nije bilo moguće detektirati). S Mab 266 bilo je moguće dobiti slične rezultate onima dobivenima s ljudskom CSF i CSF iz APP^{V717F} transgeničnih miševa. Peptid A β mogao se izdvojiti u ljudskoj CSF korištenjem Mab 266, bez obzira na to jesu li protutijela 3D6 ili QCB_{40,42} korištena za Western hibridizaciju.

Primjer 3

Dokazivanje kompleksa peptid A β -266 pomoću dvodimenzionalne gel elektroforeze

Uzorak koji je sadržavao 50 ng peptida A β inkubirali smo s 2 μ g Mab 266 tri sata pri 37°C. Istovjetno smo inkubirali samo protutijelo Mab 266 kao kontrolu.

Uzorke smo zatim nanijeli na dvodimenzionalnu gel elektroforezu.

U prvoj dimenziji, inkubirane smo uzorke nanijeli na NDGGE kao što je opisano u Primjeru 1. Poliakrilamidni gel smo zatim izrezali na pojedinačne linije okomito na smjer tijeka u prvoj dimenziji i napravili smo odvajanje u gelu u denaturirajućim/reducirajućim uvjetima pomoću SDS-PAGE (Tricin urea gel) u drugoj dimenziji. Prisustvo signala detektirali smo bilo bojenjem s Ponceau S (bilo koji protein) ili specifičnim razvijanjem signala korištenjem protutijela 6E10 Mab (Sentek, Inc.) i biotiliranom anti-mišjim A β u detekcijskom sustavu baziranom na HRP.

Bojenje nitrocelulozne membrane pomoću Ponceau S omogućilo je vizualizaciju teških i lakih lanaca samog Mab 266. Potvrđeno je da je peptid A β bio u kompleksu s Mab 266 budući da je primijećena linija (signal) koja odgovara veličini od 4 kD, a koja se podudara s veličinom Mab 266 pune dužine koja je uočena nakon NDGGE prve dimenzije.

Primjer 4

Dokazivanje nejednolikog vezanja i izdvajanja

Za peptid A β , budući da cirkulira plazmom i CSF, se smatralo da se nalazi u kompleksu s proteinima, uključujući apolipoprotein E. Ovaj primjer pokazuje da protutijela na apoE, iako u mogućnosti da se vežu na kompleks, ne izdvajaju apoE iz ostatka kompleksa.

- 5 Inkubirali smo komplekse apoE (500 ng) jedan sat pri 37°C. Inkubirane smo uzorke zatim nanijeli na NDGGE koristeći postupak opisan u Primjeru 1. Nakon NDGGE, izvodili smo Western hibridizaciju s afinitetno pročišćenim protutijelima anti-apoE iz kože, te detektirali s ECL. Kada nijedno protutijelo nije prisutno, mogli smo detektirati apoE na 8-13 nm, što se slaže s činjenicom da je prisutan u lipoproteinskim česticama. Prisustvo monoklonskog ili poliklonskog protutijela na apoE rezultira u populaciji koja ima odmak od apoE na veće molekularne mase, «super odmak» («super shift»). To
10 pokazuje da protutijela na apoE nisu izdvojila, odnosno, odstranila apoE iz lipoproteinske čestice, već su se vezala na apoE na lipoproteine, stvarajući komplekse veće molekularne mase.

Primjer 5

Protutijela anti-apoE ne onemogućuju izdvajanje A β

- 15 Uzorak od 100 μ L ljudske CSF inkubirali smo bilo sa samim Mab 266 ili s poliklonskim anti-apoE, ili s oba protutijela, 60 minuta pri 37°C. Uzorke smo zatim analizirali pomoću NDGGE kao što je opisano u Primjeru 1 i signale detektirali kao što je opisano u Primjeru 1.
- 20 Rezultati pokazuju da je signal dijametra od prilike 11 nm, karakterističan za izdvojeni 266-A β kompleks peptida, vidljiv dok god je Mab 266 dodavan u uzorak. To je slučaj bez obzira na to je li prisutan ili nije anti-apoE. Ovaj signal, koji predstavlja izdvojeni A β , također se pojavljuje ako se u inkubacijsku smjesu, u prisutnosti Mab 266, doda 50 ng peptida A β . Dakle, promjena molekulske mase apoE u prisutnosti protutijela anti-apoE ne ometa izdvajanje peptida A β protutijelom Mab 266.

Primjer 6

Izdvajanje peptida A β *in vivo*

- 30 Transgenični miševi APP^{V717F}, koji se također nazivaju i miševi PDAPP, prekomjerno eksprimiraju mutirani oblik ljudskog proteina APP. Ti miševi produciraju humani APP u centralnom živčanom sustavu i imaju povišene razine ljudskog peptida A β koji cirkulira CSF i plazmom. Osam mjeseci starim miševima injicirali smo intravenozno fiziološku otopinu ili 100 μ g Mab 266. Iskrvarili smo ih 10 minuta nakon inicijalne injekcije i ponovno 20 sati nakon inicijalne injekcije.
- 35 Uzorke koji su sadržavali 20 μ L plazme iz svake životinje analizirali smo pomoću NDGGE i Western hibridizacijom pomoću protutijela 3D6 kao što je opisano u Primjeru 1. U životinjama kojima je injicirana fiziološka otopina nije se pokazalo prisustvo signala od 11 nm karakterističnog za izdvojeni peptid A β , bilo nakon 10 minuta ili nakon 20 sati. S druge strane, u dvijema životinjama kojima je injicirano protutijelo Mab 266 pokazala se prisutnost ovog signala nakon 20 sati.
- 40 U ovoj smo studiji koristili dva mjeseca stare mišve APP^{V717F}. Na nulti dan miševi nisu primili Mab 266 ili su primili 1 mg Mab 266, odnosno 100 μ g ovog protutijela. Uzorke plazme uzeli smo dva dana prije davanja protutijela i na dane 1, 3, 5 i 7. Uzorke plazme smo nanijeli na NDGGE, nakon čega je slijedila Western hibridizacija i detekcija s 3D6, kao što je opisano u Primjeru 1. U svim vremenskim razdobljima nakon davanja Mab 266 detektirali smo kompleks 266/A β ,
45 osim ako je uzorak plazme bio obrađen s proteinom G, koji se veže na imunoglobuline, čime učinkovito uklanja Mab 266. Razina kompleksa tijekom testiranog vremenskog razdoblja bila je ujednačena, osim laganog pada sedmog dana u životinjama kojima smo injicirali 100 μ g Mab 266; razine u životinjama kojima smo davali 100 μ g općenito su bile uvijek niže nego one pronađene u miševima kojima smo davali 1 mg ovog protutijela.
- 50 U dva miša stara dva mjeseca intravenozno smo injicirali 1 mg Mab 266 i od svakog uzeli 25 μ L uzorka plazme. Uzorke plazme smo nanijeli na NDGGE nakon čega smo napravili Western hibridizaciju kao što smo opisali ranije, osim što smo nakon vezanja s biotiniziranim 3D6 detekciju vršili pomoću streptavidin ¹²⁵I (Amersham) i eksponirali na aparatu za fosforescenciju (phosphorimager). Razinu kompleksa smo procijenili u usporedbi sa standardnom krivuljom koristeći poznate količine A β ₄₀ u kompleksu sa saturirajućim količinama Mab 266 i sličnom detekcijom. Procijenili smo da je
55 količina peptida A β vezanog na Mab 266 od prilike 100 ng/mL, što predstavlja povišenje od od prilike 1000 puta prema endogenom peptidu A β u tim miševima, koju smo procijenili na oko 100 pg/mL. To je također slično razini peptida A β u mozgu miševa APP^{V717F} prije odlaganja A β (50-100 ng/g); ljudski A β i ljudski A β u miševima APP^{V717F} Tg stvara se gotovo isključivo u mozgu. Dakle, čini se da prisustvo Mab 266 u plazmi djeluje kao odvod peptida A β , olakšavajući neto sitjecanje peptida A β iz centralnog živčanog sustava u plazmu. Ovaj je pojačani neto istjecanje vjerojatno rezultat i
60 pojačanog istjecanja A β iz CNS u plazmu kao i prevencije ponovnog vraćanja A β iz plazme u mozak.

Točnu veličinu izdvojenog peptida A β potvrdili smo stavljanjem 20 μ L uzoraka plazme dobivenih iz miševa APP^{V717F}, 24 sata nakon što smo im injicirali 1 mg Mab 266, na gelove Tris-tricin SDS-PAGE te Western hibridizacijom koristeći protutijelo anti-A β 6E10 prije, ili nakon, izlaganja proteinu G korištenjem zrnaca na koje je on vezan. Signal koji je otklonjen proteinom G detektiran je na 4-8 kD, što odgovara prisutnosti monomera i moguće dimera peptida A β .

Miševima APP^{V717F} smo intraperitonealno dali ili PBS (n=7) ili 500 μ g biotiniliranog Mab 266 – kao, m266B (n=9). Prije i 24 sata nakon injekcije, plazmu smo analizirali na ukupnu količinu peptida A β korištenjem modificiranog postupka ELISA opisanog u Johnson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555; i Bales, K.R., *et al.*, *Nature Genet.* (1997) 17:263-264. Ukupni A β vezan na m266B mjerili smo koristeći Optiplate s 96 bunarića (Packard, Inc.) prekrivene s m3D6. Razrijeđene uzorke plazme i standarde (različite koncentracije A β ₄₀ i m266B) smo inkubirali preko noći u prekrivenim pločicama i količinu ukupnog kompleksa A β /m266B smo određivali korištenjem ¹²⁵I-streptavidin. Dodatno, uzorke plazme dobivene nakon 24 sata smo obradili s proteinom G da bismo odredili količinu peptida A β koji nije vezan na Mab 266, te smo određivali i A β _{TOTAL} i A β ₄₂ testom ELISA u CSF. U životinjama kojima je injiciran PBS razine peptida A β u plazmi bile su 140 pg/mL i prije i poslije injekcije. Razine u plazmi bile su slične u miševima kojima je injicirano Mab 266 prije injekcije, ali razine peptida A β koji nije vezan na Mab 266 nisu se mogle dektirati 24 sata nakon injekcije.

Također smo mjerili i razine u CSF, koja predstavlja izvanstanični dio unutar CNS i koncentracija molekula u CSF odražava donekle koncentraciju spojeva izvanstaničnom prostoru u mozgu. CSF smo izolirali iz dijela cisterna magna. Miševe smo anestetizirali s pentobarbitalom i odstranili smo miškulaturu s baze lubanje do prvog kralješka. CSF smo skupljali pažljivom punkcijom arahnoidne membrane koja pokriva cisternu s mikro iglom pod disekcijskim mikroskopom i uvlačenjem CSF u polipropilensku mikropipetu. Nakon 24 sata pronašli smo povišenje ukupnog peptida A β u CSF miševa kojima je injicirano Mab 266 te od prilike dvostruko povišenje peptida A β ₄₂ u usporedbi s CSF izolirane iz miševa kojima je injiciran PBS. To smo potvrdili korištenjem denaturirajuće gel elektroforeze, nakon čega je slijedila Western hibridizacija s protutijelom specifičnim na A β ₄₂, 21F12.

U dodatnom pokusu, miševima APP^{V717F} Tg starim tri mjeseca injicirali smo ili PBS ili Mab 266 intravenozno te smo određivali razine i A β ₄₀ i A β ₄₂ u CSF na slijedeći način:

Za mjerenje A β ₄₀ koristili smo monoklonsko protutijelo m2G3 specifično na A β ₄₀. Opisani postupak ELISA (Johnson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555) smo modificirali u RIA zamjenom reagensa streptavidin-HRP sa ¹²⁵I-streptavidinom. Za uzorke plazme i CSF koristili smo proceduru pod nedenaturirajućim uvjetima koji nisu sadržavali gvanidin u puferima. Da bismo dobili A β u homogenatu mozga koji je topiv i netopiv u karbonatu, uzorke smo homogenizirali sa 100 mM karbonatom, 40 mM NaCl, pH 11,5 (4°C), centrifugirali pri 10000 x g tijekom 15 minuta te je dobivena frakcija A β u supernantu (topiv) i frakcija u talogu (netopiv) kao što je opisano (Johnson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555) i nabrojeno ranije. Kompleks A β /Mab 266 u plazmi mjerili smo modificiranim postupkom RIA. Miševima smo injicirali biotinilirani Mab 266 (Mab 266B) i izolirali smo plazmu u različitim vremenskim točkama. Ukupni A β vezan na Mab 266 smo mjerili koristeći pločice Optiplate s 96 bunarića (Packard, Inc.) prekrivene s m3D6. Razrijeđene uzorke plazme i standarde (različite koncentracije A β ₄₀ i Mab 266B) smo inkubirali preko noći u prekrivenim pločicama i odredili smo količinu ukupnog kompleksa A β /Mab 266B koristeći ¹²⁵I-streptavidin.

Tri sata nakon intravenozne injekcije Mab 266 uočeno je dvostruko povišenje razine A β ₄₀ u CSF i povišenje A β ₄₂ koje nije bilo značajno. No, nakon 24 sata i 72 sata pokazano je dvosturko do trostruko povišenje razine i A β ₄₀ i A β ₄₂ u CSF. Slične smo rezultate dobili koristeći analizu spojenih uzoraka CSF denaturirajućim gelom nakon čega je načinjena Western hibridizacija protutijelom na A β . Istjecanje A β kroz inersticijalnu tekućinu mozga, koju u određenom stupnju odražava razina u CSF, je vjerojatno zaslužno za opaženu povišenu razinu A β u CSF.

Značajno je da promjena u razini peptida A β u CSF ne može biti pripisana ulasku Mab 266 u CSF, budući da su razine izmjerene 24 sata nakon injekcije, koje su manje od 0,1% razine Mab 266 u plazmi, nedovoljne da bi bile zaslužne za te promjene. Ti rezultati upućuju na to da je peptid A β «odvučen» iz parenhima mozga u CSF prisutnošću protutijela u krvi.

Oblike peptida A β koji su topivi u PBS ili karbonatnom puferu mjerili smo u cerebralno kortikalnim homogenatima onih istih miševa kojima smo ranije injicirali Mab 266 i u kojima smo analizirali CSF kao što je ranije opisano. Slična povišenja tih topivih oblika opažena su u kortikalnim homogenatima.

Primjer 7

Mab 266 djeluje kao odvod peptida A β in vitro

Konstruirali smo komoru za dijalizu kao sustav *in vitro* da bismo testirali sposobnost Mab 266 da djeluje kao odvodnik za peptide A β . Jedan mL ljudske CSF smo smjestili na vrh komore sačinjene od polipropilenske cjevčice podijeljene membranom za dijalizu sa specifičnim ograničenjem u razini od 10-100 kD od dna komore koja je sadržavala 75 μ L PBS sa ili bez 1 μ g Mab 266.

Činilo se da se ravnoteža uspostavila nakon tri sata, kao što je određeno nanošenjem materijala s dna komore na kisele gelove uree, nakon čega je učinjena Western hibridizacija na peptid A β s 6E10 u različitim vremenskim točkama. Uzorke smo denaturirali u mravljoj kiselini do konačne koncentracije od 80% (vol/vol) i reducirali s β -merkaptotanolom (1%). Uzorke smo podvrgnuli elektroforezi (od anode prema katodi) u puferu za elektroforezu 0,9 M octene kiseline kroz 4% do 35% gel gradijenta poliakrilamida, koji je sadržavao 6 M ureu, 5% (vol/vol) glacijalne octene kiseline i 2,5% TEMED. Kiseli pH gela smo neutralizirali prije transfera na nitrocelulozu. Nakon toga, koristili smo standardnu tehniku Western hibridizacije da bismo identificirali A β . Detektirane linije odgovarale su 4 kD.

Količinu A β odstranjenu s vrha komore odredili smo analizom ELISA vrha i dna komore (n=4) nakon tri sata. Rezultati za različita ograničenja molekularnih masa u prisutnosti i bez prisutnosti Mab 266 prikazani su na slici 1. Kao što je prikazano, dok su samo minimalne količine peptida A β prešle membranu kad smo stavili PBS u dno komore, 50% peptida A β je izdvojeno u dnu komore kad je bilo prisutno Mab 266 i ograničenje molekularne mase bilo 25 kD; veće količine su prešle membranu kad smo ograničenje molekularne mase povisili na 100 kD, kada je gotovo 100% peptida A β prešlo kroz membranu.

Također smo primijetili da su protutijela anti-N-terminalni kraj A β 3D6 i 10D5 mogla potaći prelazak peptida A β kroz membranu u ovom sistemu, iako nisu bila u mogućnosti izdvojiti peptid A β u testovima opisanima u Primjeru 1. Ti rezultati pokazuju da protutijela na peptid A β imaju dovoljan afinitet pod tim uvjetima da izdvoje peptid od drugih za njih vezanih proteina u fiziološkim otopinama, ali da su Mab poput 266 koja su imunoreaktivna s epitopom na pozicijama 13-28 znatno učinkovitija i vežu se većim afinitetom.

U sličnim testovima, apoE koji izlučuju astrociti koji je pročišćen kao što je opisano u DeMattos, R.B., *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1998) 273:4206-4212; Sun, Y., *et al.*, *J. Neurosci.* (1998) 18:3261-3272, imao je mali, ali statistički značajan učinak u povišenju mase peptida A β na dnu komore. Nismo uočili očigledan učinak kada smo Mab 266 zamijenili poliklonskim protutijelom IgG ili BSA.

Primjer 8

Tijek peptida A β iz CNS u plazmu

Jedan μ g A β ₄₀ otopili smo u 5 μ L CSF iz štakora da ga se održi topivim i zatim ga injicirali u subarahnoidni prostor u cisterna magna miševa Swiss-Webster divljeg tipa, koji su prije toga primili intravenozno injekcije bilo PBS (n=3) ili 200 μ g biotinitiranog Mab 266 (n=3). Pri različitim vremenskim točkama nakon obrade, odredili smo A β _{TOTAL} u plazmi miševa postupkom ELISA, koristeći 3D6 kao prekrivajuće protutijelo i standarde A β pomiješanih s viškom biotinitiranog 266. Svaki uzorak plazme smo spike s viškom biotinitiranog 266 nakon odstranjivanja iz svake životinje za određivanje A β postupkom ELISA. U miševima kojima je injiciran PBS detektirali smo minimalne detektabilne količine peptida na razinama od 0,15 ng/mL kao maksimalne količine nakon 30-60 minuta, nakon čega su razine bile gotovo nule. U miševima kojima smo injicirali Mab 266, naprotiv, peptid A β u plazmi dosegao je razine od oko 330 puta više od onih detektiranih nakon 60 minuta u miševima kojima je injiciran PBS (od prilike 50 ng/mL) i dosegnule vrijednosti od od prilike 90 ng/mL nakon 180 minuta.

Tu smo proceduru ponovili koristeći bilo 200 μ g (n=3) ili 600 μ g (n=3) koje smo injicirali intravenozno u miševe APP^{V717F} stare dva mjeseca. Mab 266 smo injicirali intravenozno miševima APP^{V717F} +/- starim 3 mjeseca u gore navedenim dozama. Prije injiciranja i pri različitim vremenskim točkama nakon intravenoznog injiciranja, određivali smo koncentracije A β vezanog za Mab 266 u plazmi postupkom RIA. Detaljne rezultate iz jednog ilustrativnog miša smo prikazali na Slici 2.

Pronašli smo da je koncentracija A β vezanog za monoklonsko protutijelo Mab 266 povišena u odnosu na bazalnu vrijednost od 150 pg/mL na razinu od preko 100 ng/mL tijekom četiri dana. Analizirajući rane vremenske točke na krivulji, odredili smo da je neto rata ulaska A β _{TOTAL} u plazmu miševa APP^{V717F} Tg bila 42 pg/mL/minuti u prisustvu saturirajuće količine protutijela.

Učinci Mab 266 na razine A β u plazmi u divljem tipu i miševima APP^{V717F} Tg kao i učinci protutijela na koncentracije A β u CSF pokazuju da prisustvo cirkulirajućih Mab 266 rezultira u promjeni ravnoteže istjecanja A β ili transport između CNS i plazme.

Primjer 9Učinak Mab 266 na A β u mozgu

Miševe APP^{V717F}+/+ stare četiri mjeseca smo obrađivali svaka dva tjedna tijekom pet mjeseci s intraperitonealnim injekcijama fiziološke otopine, Mab 266 (500 μ g) ili IgG iz kontrolnih mišev (100 μ g, Pharmigen). Miševe smo žrtvovali u starosti od devet mjeseci, i određivali smo odloženi A β u korteksu. Postotak područja prekrivenog A β -imunoreaktivnošću, što je određeno zečjim protutijelom pan-A β (QBC, Inc.), je kvantificiran u kori mozga neposredno prekrivajući dorzalni hipokampus kao što je opisano s Holtzman, D.M., *et al.*, *Ann. Neurol.* (2000) 97:2892-2897. Rezultati su prikazani na slici 3A. U ovoj starosti, oko pola od svake skupine još nije počela razvijati naslage A β . No, % miševa s >50% opterećenosti A β u kori mozga bila je značajno niža ($P=0,02$, test Chi-square) kod miševa obrađenih s 266. Dok miševi APP^{V717F} mogu razviti velike količine naslaga A β tijekom devet mjeseci, velika je varijabilnost s oko 50% koji ne posjeduju naslage i oko 50% koji pokazuju znatne naslage. Kod miševa obrađenih s PBS i IgG, 6/14 i 5/13 miševa imalo je više od 50% kore mozga prekrivene s A β bojenjem, dok je samo jedan od 14 miševa obrađenih s Mab 266 imao tu razinu obojenja. Skoro 50% životinja u svim skupinama još nije razvilo naslage A β u starosti od 9 mjeseci. Čini se da je to posljedica parentalnog porijekla individualnih miševa u našoj skupini, budući da, iako su svi miševi u studiji potvrđeni da su APP^{V717F}+/+, visoke razine naslaga A β primjećene su samo u miševim dobivenim iz 4/8 sparenih parova (okoti visoke patologije; High pathology). Miševi dobiveni od ostala 4 sparena para bili su gotovo bez naslaga A β (okoti niske patologije; Low pathology). Koristeći parentalno porijeklo kao ko-varijablu, pokazan je jaki i značajan učinak m266 u reduciranju naslaga A β ($p=0,0082$, slika 3B).

Primjer 10Mab 266 injicirano periferno ne veže se za plakove u miševima APP^{V717F} Tg

Da bismo odredili je li Mab 266 injicirano u trbušnu šupljinu tijekom 5 mjeseci vezano za A β u mozgu, napravili smo sekcije mozga iz miševa APP^{V717F}+/+ starih devet mjeseci, koji su sadržavali naslage A β i bili su obrađeni bilo s Mab 266, fiziološkom otopinom ili kontrolnim IgG. Procesiranje tkiva i imunohistokemijsko bojenje napravili smo kako je ranije opisano (Bales, K.R., *et al.*, *Nature Genet.* (1997) 17:263-264). Tkivo iz svih skupina životinja inkubirali smo s anti-mišjim IgG obilježenim fluoresceinom (Vector, Inc.) i zatim analizirali pod fluorescentnim mikroskopom. Ni u jednoj skupini nismo uočili obojenje specifično za naslage A β . Suprotno tome, kada smo nanijeli Mab 266 na sekcije prije inkubacije sekcija s anti-mišjim IgG, naslage A β smo jasno detektirali.

Primjer 11Učinak obrade s protutijelom 266 na kogniciju transgениčnih hemizigotnih miševa PDAPP starih 24 mjeseca

Koristili smo šesnaest hemizigotnih transgениčnih miševa (APP^{V717F}). Miševi su na početku studije bili stari od prilike 24 mjeseca. Sve miševe smo injicirali u trbušnu šupljinu (i.p.). Pola je miševa primalo tjedno injekcije pufera (PBS; phosphate buffered saline, «kontrola»), a druga je polovica primala 500 mikrograma mišjeg protutijela 266 otopljenog u PBS. Tri dana nakon zadnje injekcije procijenili smo ponašanje miševa korištenjem zadatka prepoznavanje objekta, kao što je opisano u J.-C. Dodart, *et al.*, *Behavioral Neuroscience*, 113 (5) 982-990 (1999). Izračunavali smo indeks prepoznavanja ($T_b \times 100 / (T_b - T_A)$). Rezultati su prikazani ispod, u Tablici 1.

Tablica 1. Opisna statistika za indeks prepoznavanja

	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Standardna pogreška
Kontrola (PBS)	8	71,2**	8,80	3,11
Protutijelo 266	8	54,35	7,43	2,62

** $p=0,0010$

Tjedna administracija 500 mikrograma protutijela 266 hemizigotnim transgениčnim miševima starim 24 mjeseca povezana je sa značajnom promjenom ponašanja. Transgениčni miševi tretirani s protutijelom imali su indekse prepoznavanja slične onima u kontrolnim životinjama divljeg tipa (J.-C. Dodart, *et al.*). Razlika u indeksu prepoznavanja bila je statistički značajna na razini vjerojatnosti od 0,001. Povišeni indeks prepoznavanja pokazatelj je da će tretman s protutijelom koje veže beta amiloidni peptid u regiji aminokiselina 13-28 vratiti promijenjeno ponašanje koje je dokumentirano u ovom mišjem modelu Alzheimerove bolesti. Dakle, administracija protutijela koji vežu beta amiloidni peptid u regiji aminokiselina 13-28 liječit će oboljenja poput Alzheimerove bolesti i Downovog sindroma i zadržat će kognitivno propadanje u pravilu povezano s progresijom bolesti.

Opterećenje amiloidom (% područja prekrivenog s imunoreaktivnim materijalom nakon bojenja s anti-A β protutijelima 3D6 ili 21F12) kvantificirali smo u kori mozga neposredno prekrivajući hipokampus, uključujući područja cingulate i parietalne kore mozgov životinja starih 24 mjeseca koje su obrađene s mišjim protutijelima 266 tijekom sedam tjedana, kao što je gore opisano. Rezultati su prikazani niže, u tablici. Razlike između obrađenih skupina nisu statistički značajne.

Tablica 2. Opterećenje amiloidnim plakovima u miševima APP^{V717F} nakon obrade s mišjim 266 protutijelom anti-A β

	N	Korištenje 3D6		Korištenje 21F12	
		Srednja vrijednost	Standardna pogreška	Srednja vrijednost	Standardna pogreška
Kontrola (PBS)	7	44,3	5,93	0,77	0,14
Protutijelo 266	8	38,0	2,96	0,93	0,11

Kod ovih vrlo starih životinja obrada s mišjim protutijelom 266 nije rezultirala u značajno različitim opterećenjem amiloidima kada se usporede a skupinom obrađenom s PBS, izmjereno bilo koristeći 3D6 ili 21F12. Nadalje, opterećenje s A β bilo je znatno veće i značajno povišeno u usporedbi s opterećenjem amiloidima kod mlađih životinja (vidi niže) koje nisu mogle razaznati novi objekt od poznatog u zadatku prepoznavanja objekta. Na najveće iznenađenje, ti rezultati pokazuju da protutijela anti-A β mogu vratiti kognitivne nedostatke bez potrebe da se reducira opterećenje amiloida *per se*.

Nakon obrade tijekom 7 tjedana, indeks prepoznavanja skupine obrađene s m266 nije bila značajno različita od one koja se očekuje kod miševa divljeg tipa skupine stare 24 mjeseca. To pokazuje potpni obrat kognitivnog propadanja u tim transgeničnim životinjama.

Primjer 12

Učinak administracije protutijela 266 na kogniciju mladih transgeničnih hemizigotnih miševa PDAPP

Koristili smo pedeset i četiri (54) homozigotna transgenična miša (APP^{V717F}). Dvadeset i tri (23) miša su bila stara od prilike dva mjeseca na početku studije. Ostali miševi su bili od prilike stari četiri mjeseca na početku studije. Trajanje obrade bilo je pet mjeseci. Dakle, na kraju studije miševi su bili stari ili od prilike stari sedam (7) mjeseci ili od prilike stari devet (9) mjeseci.

Sve smo injekcije davali u trbušnu šupljinu (i.p.). Svaki je miš u kontrolnoj skupini «PBS» tjedno primao injekciju PBS (phosphate buffered saline; 200 μ l). Svaki je miš u kontrolnoj skupini «IgG» primao tjedno injekciju IgG1 kontrolu (100 μ g/mišu/tjednu). Svaki je miš u skupinama «visoke doze» primao je tjedno injekciju 500 mikrograma protutijela 266 otopljenog u PBS («HD»). Svaki je miš u skupini «niske doze» primao tjedno injekciju od 100 mikrograma protutijela 266 otopljenog u PBS («LD»). Tri dana nakon zadnje injekcije ponašanje smo životinja assessed korištenjem zadatka prepoznavanja objekta, kao što je opisano ranije u Primjeru 10, i indeks raspoznavanja smo izračunali kao razliku između vremena potrošenog na nove objekte i vremena potrošenog na poznate objekte. Rezultati su prikazani niže u Tablici 3. Podaci su grupirani prema starosti životinja na kraju studije.

Tablica 3. Opisna statistika za indeks raspoznavanja

Indeks prepoznavanja (minute)

	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Standardna pogreška
Miševi stari 7 mjeseci				
PBS	7	2,12	4,22	1,59
IgG	8	0,81	3,64	1,29
HD	8	10,04*	6,52	2,30
Miševi stari 9 mjeseci				
PBS	7	1,87	3,54	1,34
IgG	8	0,96	3,51	1,24
LD	8	10,75*	6,44	2,28
HD	8	12,06***	7,82	2,76

*p<0,05

***p<0,0001

Uzeti zajedno, ti podaci podupiru zaključak da administracija protutijela 266, protutijela usmjerenog na centralnu domenu A β , smanjuje depozicijske plakove kod transgeničnih miševa APP^{V717F} starih 7-9 mjeseci, kao što popravljaju nedostatke ponašanja koji su okarakterizirani ranije. Tretman bolesnika s protutijelom usmjerenim na centralnu domenu peptida A β inhibirat će ili prevenirati kognitivno propadanje u pravilu asocirano s progresijom bolesti, i vratit će ga u normalu.

Diskriminacijski indeks obrađenih životinja nije bio značajno različit od onog koji bi bio očekivan za divlji tip miševa iste starosti. Dakle, isto kao i kod starijih životinja (Primjer 11), obrada s m266 potpuno je vratila kognitivno propadanje na normalu u tih mlađih transgeničnih životinja.

Primjer 13

Sinteza humaniziranog protutijela 266

Stanice i protutijela. Staničnu liniju melanoma miša Sp2/0 dobili smo od ATCC (Manassas, VA) i uzgajali u mediju DME, koji sadrži 10% FBS (Cat # SH32661.03, HyClone, Logan, UT) u inkubatoru pri 37°C. Mišje hibridoma stanice 266 smo uzgajali prvo u mediju RPMI-1640 koji je sadržavao 10% FBS (HyClone), 10mM HEPES, 2mM glutamin, 0,1 mM neesencijalne aminokiseline, 1 mM natrijev piruvat, 25 μ g/mL gentamicin, a zatim smo ih umnožili u mediju bez seruma (Hybridoma SFM, Cat# 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) koji se sadržavao 2% FBS niskog Ig (Cat # 30151.03, HyClone) u roler flašama volumena 2,5 litre. Mišje monoklonsko protutijelo 266 (Mu266) smo pročistili iz supernatanta kulture afinitetnom kromatografijom, koristeći kolone protein-G Sefaroze. Biotinilirano Mu266 smo pripremili koristeći EZ-povezano Sulfo-NHS-LC-LC-biotin (Cat# 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Kloniranje varijabilne regije cDNAs. Ukupnu RNA smo izolirali iz od prilike 10⁷ hibridoma stanica koristeći reagens (TRIzol) (Life Technologies) i izolirali smo poly(A)⁺RNA pomoću PolyAtract mRNA sistema za izolaciju (Promega, Madison, WI) prema protokolu proizvođača. Dvostruku cDNA smo sintetizirali pomoću SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA) slijedeći protokol proizvođača. Varijabilnu regiju cDNAs za lake i teške lance smo umnožili lančanom reakcijom polimeraze (PCR; polymerase chain reaction) koristeći 3' početnice koje naliježu bilo na mišju kapa bilo gama nevarijabilnu regiju, i 5' univerzalnu početnicu dobivenu u SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit. Za VL PCR, 3' početnica ima slijed:

5' -TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'

[SEQ ID NO:13]

s nukleotidima 17-46 koji se vežu na regiju Ck miša. Za VH PCR, 3' početnica ima degenerirajuće slijedove:

5' -TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC-3'

A G T

T

[SEQ ID NO:14]

s mjestima 17-50 koja se vežu za mišji gama lanac CH1. VL i VH cDNA smo subklonirali u vektor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) da bismo im odredili slijed. Sekvencioniranje DNA smo izvodili PCR cikličkim reakcijama sekvencioniranja s fluorescentnim dideoksi terminatorima (Applied Biosystems, Foster City, CA) prema instrukcijama proizvođača. Reakcije sekvencioniranja smo analizirali na sekvenatoru DNA Model 377 (Applied Biosystems).

Konstruiranje varijabilnih regija humaniziranog 266 (Hu266). Humanizaciju regija V mišjeg protutijela izvodili smo kao što je opisano u Queen et al. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1988)]. Okvir humane regije V koji smo koristili kao akceptor za Mu 266 CDRs smo izabrali na bazi homologije slijedova. Za konstruiranje molekularnog modela varijabilnih regija koristili smo kompjutorske programe ABMOD i ENCAD [Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620 (1983)]. Aminokiseline u ljudskim regijama V za koje smo predvidjeli da su u kontaktu s CDRs smo zamijenili s odgovarajućim aminokiselinama iz Mu266. To smo učinili s aminokiselinama na mjestima 46, 47, 49 i 98 teškog lanca i na mjestu 51 lakog lanca. Aminokiseline u humaniziranoj regiji V za koje je pronađeno da su rijetke u istoj podgrupi regije V smo zamijenili s konsenzus aminokiselinama da bismo otklonili moguću imunogenost. To smo učinili na mjestima 42 i 44 lakog lanca.

Konstruirali smo gene za varijabilne regije lakog i teškog lanca te ih umnožili koristeći osam preklapajućih sintetičkih oligonukleotida dužine u rasponu od od prilike 65 do 80 nukleotida [He, X.Y., et al., *J. Immunol.* 160:1029-1035

(1998)]. Oligonukleotidi su nalijegali par po par, a zatim su produženi Klenowim fragmentom DNA polimeraze I, čime su dobivena četiri dvostruka odsječka. Dobivene smo odsječke denaturirali, a na njih je nalijegao par početnica koje su produžene Klenowim fragmentom, nakon čega su dobivena dva odsječka. Ti su odsječki denaturirani, početnice su hibridizirane, i ponovno su produženi, nakon čega je dobiven gen pune dužine. Dobiveni produkt smo umnožili metodom PCR koristeći Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Odsječke dobivene umnažanjem PCR smo pročistili u gelu i uklonirali u vektor pCR4Blunt-TOPO. Nakon što smo potvrdili njihove slijedove, gene VL i VH smo pocijepali s MluI i XbaI, pročistili u gelu i subklonirali svakog u vektore za ekspresiju lakog i teškog lanca, čime smo dobili pVk-Hu266 i pVg1-Hu266 (vidi slike 6 i 7, zasebno, u ovoj prijavi) [Co, M.S., *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149-1154 (1992)]. Zrelo humanizirano protutijelo 266 eksprimirano s ovih plazmida ima slijed lakog lanca SEQ ID NO:11 i slijed teškog lanca SEQ ID NO:12.

Stabilna transfekcija. Staničnu liniju mijeloma miša Sp2/0 smo stabilno transficirali elektroporacijom korištenjem aparata Gel Pulser (BioRad, Hercules, CA) pri 360 V i 25 μ F kao što je opisano (Co, *et al.*, 1992). Prije transfekcije, linearizirali smo plazmidne DNA pVk-Hu266 i pVg1-Hu266 pomoću FspI. Od prilike 10^7 stanica Sp2/0 transficirali smo s 20 μ g pVk-Hu266 i 40 μ g pVg1-Hu266. Transficirane stanice smo suspendirali u mediju DME koji je sadržavao 10% FBS te ih nasadili u nekoliko pločica s 96 bunarića. Nakon 48 sati, stavili smo stanice u selektivni medij (medij DME koji sadrži 10% FBS, suplement mediju HT, 0,3 mg/mL ksantina i 1 μ g/mL mikopenolne kiseline). Od prilike 10 dana nakon početka selekcije analizirali smo produkciju protutijela u supernatantima kulture testom ELISA, kao što je niže pokazano. Klonove s velikim prinosom smo umnožili u mediju DME koji sadrži 10% FBS i načinili daljnju analizu ekspresije protutijela. Izabrane klonove smo zatim adaptirali na rast u Hybridoma SFM.

Mjerenje ekspresije protutijela testom ELISA. Bunariće na pločici od 96 bunarića za test ELISA (Nunc-Immuno plate, Cat # 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) smo prekrili sa 100 μ L anti-humanog protutijela IgG iz kože, specifičnog za odsječak Fc ~~lgG/Hu~~ Cat # 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) u 0,2 M natrijevom karbonat-bikarbonatnom puferu (pH 9,4) preko noći pri 4°C. Nakon ispiranja s puferom za ispiranje (PBS koji sadrži 0,1% Tween 20), bunariće smo blokirali s 400 μ L Superblock Blocking Buffer (Cat # 37535, Pierce) tijekom 30 minuta te zatim isprali s puferom za ispiranje. Uzorke koji sadrže Hu266 smo odgovarajuće razrijedili u puferu za test ELISA (100 μ L po bunariću). Kao standard smo koristili humanizirano anti-CD33 IgG1 monoklonsko protutijelo HuM195 (Co, *et al.*, 1992, iznad). Pločicu ELISA smo inkubirali tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi i bunariće smo isprali s puferom za ispiranje. Zatim smo u svaki bunarić dodali 100 μ L poliklonskog protutijela anti-humani kappa iz kože konjugiranog s HRP (cat # 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) i razrijeđenog 1/1000 u puferu ELISA. Nakon inkubacije od 1 sata pri sobnoj temperaturi i ispiranja s puferom za ispiranje, u svaki smo bunarić dodali 100 μ L supstrata ABTS (cat # 507602 i 506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Razvijanje boje smo zaustavili dodavanjem 100 μ L 2% oksalne kiseline u svaki bunarić. Apsorbanciju smo mjerili pri 415 nm koristeći OPTImax čitač za mikropločice (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Pročišćavanje Hu266. Jednu od stabilnih transformanti Sp2/0 koje su jako ekprimirale Hu266 (klon 1D6) smo prilagodili na rast u Hybridoma SFM i umnožili u roller flašama volumena 2,5 litre. Potrošeni supernatant kulture koristili smo kada je vijabilnost dosegla 10% ili niže i nanijeli ga na kolone protein-A Sefaroze. Kolone smo isprali s PBS prije nego je protutijelo bilo eluirano s 0,1 M glicin-HCl (pH 2,5), 0,1 M NaCl. Eluirani protein smo dijalizirali uz pomoć 3 izmjene 2 litre PBS i filtriranjem kroz filter veličine pora 0,2 μ m prije pohranjivanja na 4°C. Koncentraciju protutijela smo određivali mjerenjem apsorbancije pri 280 nm (1 mg/mL = 1,4 A280). Zatim smo izvodili SDS-PAGE u puferu Tris-glicin, prema standardnoj proceduri, na 4-20% gradijentu gela (Cat # EC6025, Novex, San Diego, CA). Pročišćeno humanizirano protutijelo 266 smo reducirali i nanijeli u gel SDS-PAGE. Cijelo protutijelo pokazuje dvije linije molekularnih masa od prilike 25 kDa i 50 kDa. Ti se rezultati slažu s molekularnim masama lakog i teškog lanca ili odsječkom teškog lanca izračunatog iz njihovog aminokiselinskog sastava.ž

Primjer 14

Karakteristike vezanja humaniziranog protutijela 266 *in vitro*

Uspoređivali smo učinkovitost vezanja humaniziranog protutijela 266, sintetiziranog i pročišćenog kao što je gore navedeno, s mišjim protutijelom 266 koristeći biotinizirano mišje protutijelo 266 u komparativnom testu ELISA. Bunariće pločice za test ELISA sa 96 bunarića smo prekrili sa 100 μ L peptida β -amiloida (1-42) konjugiranog s BSA u 0,2 M natrijevom karbonat/bikarbonatnom puferu (pH 9,4) (10 μ g/mL) preko noći pri 4° C. Konjugat $A\beta_{1-42}$ -BSA smo pripremili otapanjem 7,5 mg $A\beta_{1-42}$ -Cys43 (Cys s C-kraja $A\beta_{1-42}$, AnaSpec) u 500 μ L demetilsulfoksida te odmah potom dodavanjem 1500 μ L destilirane vode. Dva (2) miligrama maleimid-aktiviranog albumina seruma goveda (Pierce) smo otopili u 200 μ L destilirane vode. Dvije otopine smo pomiješali, jako pomiješali, i ostavili da odstoje na sobnoj temperaturi dva (2) sata. Peptid koji nije reagirao smo odvojili od konjugata $A\beta_{1-42}$ -BSA pomoću kolona gel kromatografije.

Nakon ispiranja bunarića s puferom PBS koji je sadržavao 0,1% Tween 20 (pufer za ispiranje) korištenjem ispirača za pločice ELISA, bunariće smo blokirali dodatkom 300 µL reagenta SuperBlock (Pierce) po bunariću. Nakon 30 minuta blokiranja, bunariće smo isprali puferom za ispiranje i otklonili višak tekućine.

5 Mješavinu biotiniziranog Mu266 (0,3 µg/mL konačna koncentracija) i kompetitorskog protutijela (Mu266 ili Hu266; započinjući od konačne koncentracije od 750 µg/mL i trostrukog serijskog razrijeđenja) u ELISA puferu je dodana u triplicatu u konačnom volumenu od 100 mL po bunariću. Kao nekompetirajuću kontrolu dodali smo 100 µL 0,3 µg/mL biotiniziranog Mu266. Kao negativnu (pozadinsku) kontrolu koristili smo 100 µL ELISA pufera. Pločicu ELISA smo inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta. Nakon ispiranja bunarića s puferom za ispiranje, u svaki smo bunarić dodali 100 µL streptavidina konjugiranog s HRP koncentracije 1 µg/mL (Cat # 21124, Pierce). Pločicu smo inkubirali pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta i isprali s puferom za ispiranje. Boju smo razvijali dodatkom 100 mL/bunariću supstrata peroksidaze ABTS (Kirkegaard and Perry Laboratories). Razvijanje boje zaustavili smo dodatkom 100 µL/bunariću 2% oksalne kiseline. Apsorbanciju smo očitavali pri 415 nm. Apsorbanciju smo stavili u odnos s log koncentracije kompetitora, linije su odgovarale točkama podataka (koristeći Prism) i za svako smo protutijelo odredili IC₅₀ koristeći postupke dobro poznate stručnjacima iz područja.

Srednja vrijednost IC₅₀ za mišje 266 bila je 4,7 µg/mL (tri odvojena pokusa, standardna devijacija = 1,3 µg/mL), a za humanizirano 266 bila je 7,5 µg/mL (tri odvojena pokusa, standardna devijacija = 1,1 µg/mL). Drugi set tri pokusa izvodili smo, bazično kao što je gore opisano, i srednju vrijednost IC₅₀ smo odredili kao 3,87 µg/mL (SD = 0,12 µg/mL), a za ljudsko 266 IC₅₀ je određen kao 4,0 µg/mL (SD = 0,5 µg/mL). Na temelju tih rezultata zaključili smo da humanizirano protutijelo 266 ima karakteristike vezanja vrlo slične onima mišjeg protutijela 266. Stoga, očekujemo da humanizirano protutijelo 266 ima vrlo slične aktivnosti *in vitro* i *in vivo* u usporedbi s mišjim 266 i da će kod ljudi izazvati iste učinke koji su pokazani s mišjim 266 u miševima.

25 Primjer 15

Karakteristike vezanja mišjih protutijela 266 i 4G8 *in vitro*

Afinitet protutijela (KD = K_d/K_a) odredili smo korištenjem BIAcore biosenzora 2000 i analizom podataka pomoću BIAevaluation (v. 3.1) software. Pomoću N-etil-N-dimetilaminopropil karbodiimida i N-hidroksisukcinimida (EDC/NHS) smo povezali sekundarno protutijelo (anti-mišje iz zeca) preko slobodnih aminoskupina na karboksilne skupine na protočnoj čeliji 2 biosenzorskog čipa (CM5). Nespecifično protutijelo IgG iz zeca smo povezali na protočnu čeliju 1 kao pozadinsku kontrolu. Monoklonska protutijela su se vezala s prinosom od 300 rezonancijskih jedinica (RU). Amiloid-beta 1-40 ili 1-42 (Biosource International, Inc.) smo zatim propustili preko čipa pri povišenim koncentracijama (1000 do 0,1 puta KD). Da bismo regenerirali čip, vezano protutijelo anti-Aβ smo eluirali s čipa ispiranjem s glicin-HCl (pH 2). Kontrolna injekcija koja nije sadržavala amiloid-beta koristila je kao kontrola za određivanja bazične vrijednosti. Da bismo odredili K_d i K_a analizirali smo senzogramе koji pokazuju faze asocijacije i disocijacije. Korištenjem te metode, odredili smo afinitet mišjeg protutijela 266, koji je iznosio 4 pM i za Aβ₁₋₄₀ i za Aβ₁₋₄₂. Afinitet protutijela 4G8 za Aβ₁₋₄₀ bio je 23 nM a za Aβ₁₋₄₂ bio je 24 nM. Unatoč razlici u afinitetima od 6000 puta za Aβ, i 266 i 4G8, koji se vežu za epitope između aminokiselina 13 i 28 peptida Aβ, učinkovito izdvajaju Aβ iz CSF čovjeka. Dakle, smještaj epitopa je ključna, a ne učinkovitost vezanja, u određivanju sposobnosti protutijela da izdvoji Aβ i omogućiti dobre i iznenađujuće prednosti ovog izuma.

Primjer 16

Mapiranje epitopa mišjeg protutijela 266 pomoću metodologije BIAcore i topivih peptida

45 BIAcore je automatizirani sistem biosenzora za mjerenje molekulskih interakcija [Karlsson R., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 145:229-240 (1991)]. Prednost BIAcore pred drugim testovima vezanja je da se vezanje antigena može mjeriti bez obilježavanja ili imobiliziranja antigena (npr. antigen zadržava nativniju konformaciju). Metodologiju BIAcore smo koristili da bismo odredili vezanje različitih odsječaka peptida amiloid-beta za mišje protutijelo 266, bazično kako je gore opisano u Primjeru 12, osim što su sva razrijeđenja napravljena s HEPES puferiranom otopinom koja je sadržavala Tween 20, različite odsječke Aβ (BioSource International) smo injicirali i injicirali smo po jednu koncentraciju svakog odsječaka (440 nM).

Odsječci amiloid beta 1-28, 12-28, 17-28 i 16-25 vezali su se na mišje protutijelo 266, dok se odsječci 1-20, 10-20 i 22-35 nisu vezali. Odsječci 1-20, 10-20 i 22-35 vezali su se na druge Mab s poznatim epitopima specifični za one regije Aβ. Pomoću ove metodologije, otkriveno je da se epitop na koji se veže mišje protutijelo 266 nalazi između aminokiselina 17 i 25 peptida Aβ. Budući da se vezanje obično događa s barem tri aminokiseline prisutnog epitopa, netko bi mogao dalje nagađati (?) da je epitop nalazi unutar mjesta 19-23.

60 Primjer 17

Karakteristike vezanja humaniziranog protutijela 266 *in vitro*

Afinitet ($KD = K_d/K_a$) humaniziranog protutijela, sintetiziranog i pročišćenog kao što je gore opisano, određen je bazično kao što je gore opisano u Primjeru 15. Pomoću ovog postupka, određeno je da afinitet humaniziranog 266 za $A\beta_{1-42}$ iznosi 4 pM.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Farmaceutski pripravak, **naznačen time** što sadrži humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na epitop koji se nalazi na položajima 13-28 u $A\beta$, namijenjen upotrebi u sprječavanju ili liječenju pretkliničke ili kliničke Alzheimerove bolesti, gdje protutijelo sadrži:

a) laki lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u lakom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO:1); ili

1 5 10 15

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

(SEQ ID NO:15);

CDR2 lakog lanca:

1 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

(SEQ ID NO:2);

i CDR3 lakog lanca:

1 5

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

(SEQ ID NO:3)

i okosnicu lakog lanca iz lakog lanca humanog imunoglobulina; i:

b) teški lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u teškom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 teškog lanca:

1 5

Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO:4)

CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:5); ili

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:16);

i CDR3 teškog lanca:

1

Gly Asp Tyr

(SEQ ID NO:6)

i okosnicu teškog lanca iz teškog lanca humanog imunoglobulina.

2. Farmaceutski pripravak, **naznačen time** što sadrži humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na epitop koji se nalazi na položajima 13-28 u $A\beta$, namijenjen upotrebi u sprječavanju, liječenju ili povratu opadanja kognitivnih funkcija kod subjekta kojem je dijagnosticirana preklinička ili klinička Alzheimerova bolest, gdje protutijelo sadrži:

a) laki lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u lakom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO:1); ili

1 5 10 15

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

(SEQ ID NO:15);

CDR2 lakog lanca:

1 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

(SEQ ID NO:2);

i CDR3 lakog lanca:

1 5

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

(SEQ ID NO:3)

i okosnicu lakog lanca iz lakog lanca humanog imunoglobulina; i:

b) teški lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u teškom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 teškog lanca:

1 5

Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO:4)

CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:5); ili

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:16);

i CDR3 teškog lanca:

1

Gly Asp Tyr

(SEQ ID NO:6)

i okosnicu teškog lanca iz teškog lanca humanog imunoglobulina.

3. Farmaceutski pripravak namijenjen upotrebi u skladu s patentnim zahtjevom 1 ili patentnim zahtjevom 2, **naznačen time** što protutijelo sadrži CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO:1);

i CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:5).

4. Farmaceutski pripravak namijenjen upotrebi u skladu s bilo kojim od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time** što protutijelo sadrži humanizirano varijabilno područje lakog lanca sa sljedećim slijedom:

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Xaa 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 Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

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

100 105 110

Arg

(SEQ ID NO:7)

gdje:

Xaa na položaju 2 je Val ili Ile;

Xaa na položaju 7 je Ser ili Thr;

Xaa na položaju 14 je Thr ili Ser;

Xaa na položaju 15 je Leu ili Pro;

Xaa na položaju 30 je Ile ili Val;

Xaa na položaju 50 je Arg, Gln ili Lys;

Xaa na položaju 88 je Val ili Leu;

Xaa na položaju 105 je Gln ili Gly;

Xaa na položaju 108 je Lys ili Arg; i

Xaa na položaju 109 je Val ili Leu;

i varijabilno područje teškog lanca sa sljedećim slijedom:

Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa 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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

(SEQ ID NO:8);

gdje:

Xaa na položaju 1 je Glu ili Gln;

Xaa na položaju 7 je Ser ili Leu;

Xaa na položaju 46 je Glu, Val, Asp ili Ser;

Xaa na položaju 63 je Thr ili Ser;

Xaa na položaju 75 je Ala, Ser, Val ili Thr;

Xaa na položaju 76 je Lys ili Arg;

Xaa na položaju 89 je Glu ili Asp; i

Xaa na položaju 107 je Leu ili Thr.

5. Farmaceutski pripravak namijenjen upotrebi u skladu s patentnim zahtjevom 4, **naznačen time** što protutijelo sadrži varijabilno područje lakog lanca sa slijedom danim u SEQ ID NO:9 i varijabilno područje teškog lanca sa slijedom danim u SEQ ID NO:10.

6. Farmaceutski pripravak namijenjen upotrebi u skladu s bilo kojim od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time** što protutijelo sadrži laki lanac sa slijedom danim u SEQ ID NO:11 i teški lanac sa slijedom danim u SEQ ID NO:12.

7. Upotreba farmaceutskog pripravka koji sadrži humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na epitop koji se nalazi na položajima 13-28 u Aβ, **naznačena time** što je navedeno protutijelo namijenjeno proizvodnji medikamenta za sprječavanje ili liječenje prekliničke ili kliničke Alzheimerove bolesti, gdje protutijelo sadrži:

a) laki lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u lakom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO:1); ili

1 5 10 15

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

(SEQ ID NO:15);

CDR2 lakog lanca:

1 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

(SEQ ID NO:2);

i CDR3 lakog lanca:

1 5

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

(SEQ ID NO:3)

i okosnicu lakog lanca iz lakog lanca humanog imunoglobulina; i:

b) teški lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u teškom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 teškog lanca:

1 5

Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO:4)

CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:5); ili

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:16);

i CDR3 teškog lanca:

1

Gly Asp Tyr

(SEQ ID NO:6)

i okosnicu teškog lanca iz teškog lanca humanog imunoglobulina.

8. Upotreba farmaceutskog pripravka koji sadrži humanizirano monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na epitop koji se nalazi na položajima 13-28 u Aβ, **naznačena time** što je navedeno protutijelo namijenjeno proizvodnji medikamenta za sprječavanje, liječenje ili povrat opadanja kognitivnih funkcija kod subjekta kojem je dijagnosticirana preklinička ili klinička Alzheimerova bolest, gdje protutijelo sadrži:

a) laki lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u lakom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO:1); ili

1 5 10 15

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

(SEQ ID NO:15);

CDR2 lakog lanca:

1 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

(SEQ ID NO:2);

i CDR3 lakog lanca:

1 5

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

(SEQ ID NO:3)

i okosnicu lakog lanca iz lakog lanca humanog imunoglobulina; i:

b) teški lanac koji ima tri područja koja određuju komplementarnost (CDR) u teškom lancu, sa sljedećim aminokiselinskim sljedovima:

CDR1 teškog lanca:

1 5

Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO:4)

CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

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

Gly

(SEQ ID NO:5); ili

1 5 10 15

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

Gly
(SEQ ID NO:16);
i CDR3 teškog lanca:

1

Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO:6)

i okosnicu teškog lanca iz teškog lanca humanog imunoglobulina.

9. Upotreba farmaceutskog pripravka u skladu s patentnim zahtjevom 7 ili patentnim zahtjevom 8, **naznačena time** što protutijelo sadrži CDR1 lakog lanca:

1 5 10 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID NO:1);

i CDR2 teškog lanca:

1 5 10 15

Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
(SEQ ID NO:5).

10. Upotreba farmaceutskog pripravka u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 7 do 9, **naznačena time** što protutijelo sadrži humanizirano varijabilno područje lakog lanca sa sljedećim slijedom:

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

(SEQ ID NO:7)

gdje:

Xaa na položaju 2 je Val ili Ile;

Xaa na položaju 7 je Ser ili Thr;

Xaa na položaju 14 je Thr ili Ser;

Xaa na položaju 15 je Leu ili Pro;

Xaa na položaju 30 je Ile ili Val;

Xaa na položaju 50 je Arg, Gln ili Lys;

Xaa na položaju 88 je Val ili Leu;

Xaa na položaju 105 je Gln ili Gly;

Xaa na položaju 108 je Lys ili Arg; i

Xaa na položaju 109 je Val ili Leu;

i varijabilno područje teškog lanca sa sljedećim slijedom:

Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa 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 Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

(SEQ ID NO:8);

gdje:

Xaa na položaju 1 je Glu ili Gln;

Xaa na položaju 7 je Ser ili Leu;

Xaa na položaju 46 je Glu, Val, Asp ili Ser;

Xaa na položaju 63 je Thr ili Ser;

Xaa na položaju 75 je Ala, Ser, Val ili Thr;

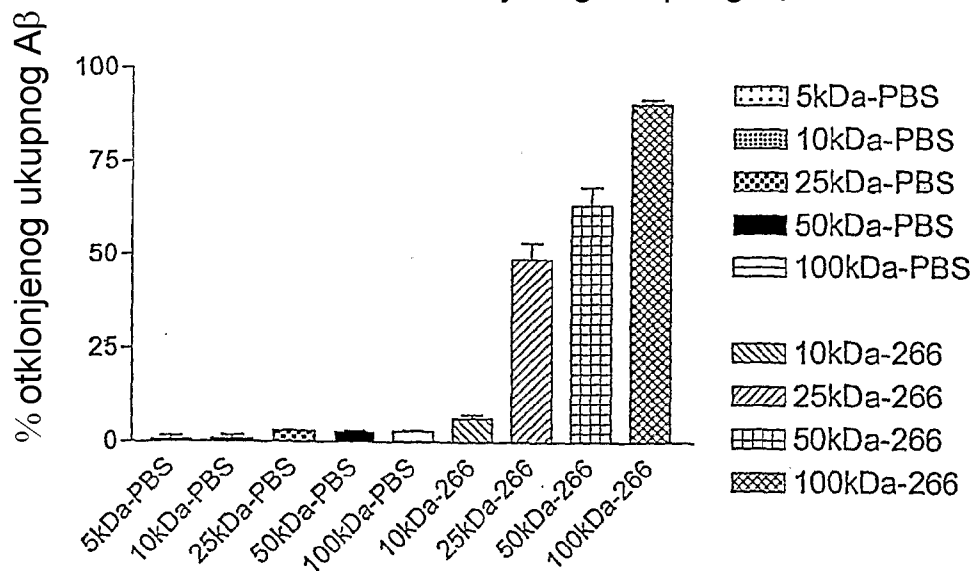
Xaa na položaju 76 je Lys ili Arg;

Xaa na položaju 89 je Glu ili Asp; i

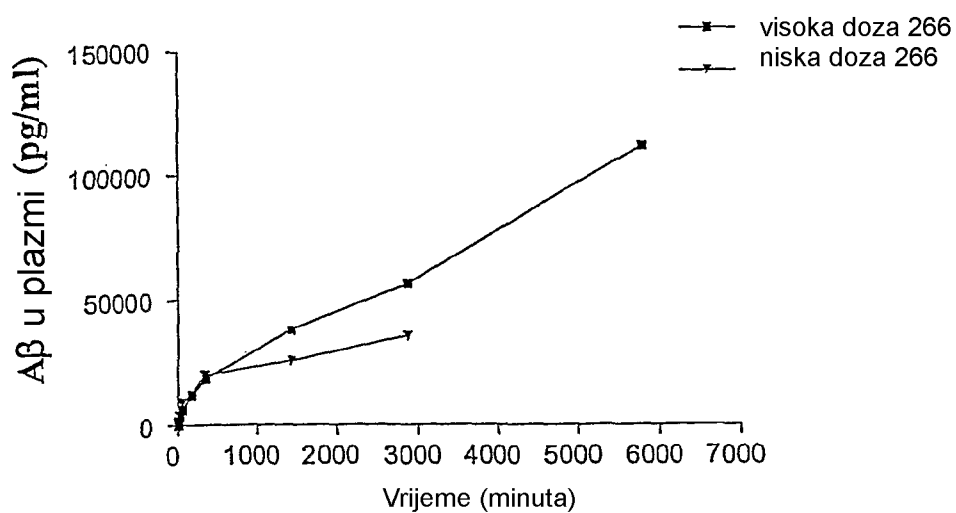
Xaa na položaju 107 je Leu ili Thr.

11. Upotreba farmaceutskog pripravka u skladu s patentnim zahtjevom 10, **naznačena time** što protutijelo sadrži varijabilno područje lakog lanca sa slijedom danim u SEQ ID NO:9 i varijabilno područje teškog lanca sa slijedom danim u SEQ ID NO:10.
12. Upotreba farmaceutskog pripravka u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 7 do 11, **naznačena time** što protutijelo sadrži laki lanac sa slijedom danim u SEQ ID NO:11 i teški lanac sa slijedom danim u SEQ ID NO:12.
13. Humanizirano antitijelo ili njegov fragment, **naznačeno time** da sadrži varijabilnu regiju lakog lanca sa slijedom SEQ ID NO:9 i varijabilnu regiju teškog lanca sa slijedom SEQ ID NO:10 za upotrebu u terapiji.
14. Humanizirano antitijelo ili njegov fragment prema patentnom zahtjevu 13, **naznačeno time** da antitijelo ili njegov fragment sadrži laki lanac danim sa slijedom SEQ ID NO:11 i teški lanac danim sa SEQ ID NO:12.
15. Humanizirano antitijelo ili njegov fragment prema patentnom zahtjevu 13 ili patentnom zahtjevu 14, **naznačeno time** da je za upotrebu u sprečavanju ili tretiranju prekliničke ili kliničke Alzheimerove bolesti.
16. Humanizirano antitijelo ili njegov fragment prema patentnom zahtjevu 13 ili patentnom zahtjevu 14, **naznačeno time** da je za upotrebu u sprečavanju, tretiranju ili revertiranju kognitivnog pada kod subjekta kod kojeg je dijagnosticirana preklinička ili klinička Alzheimerova bolest.

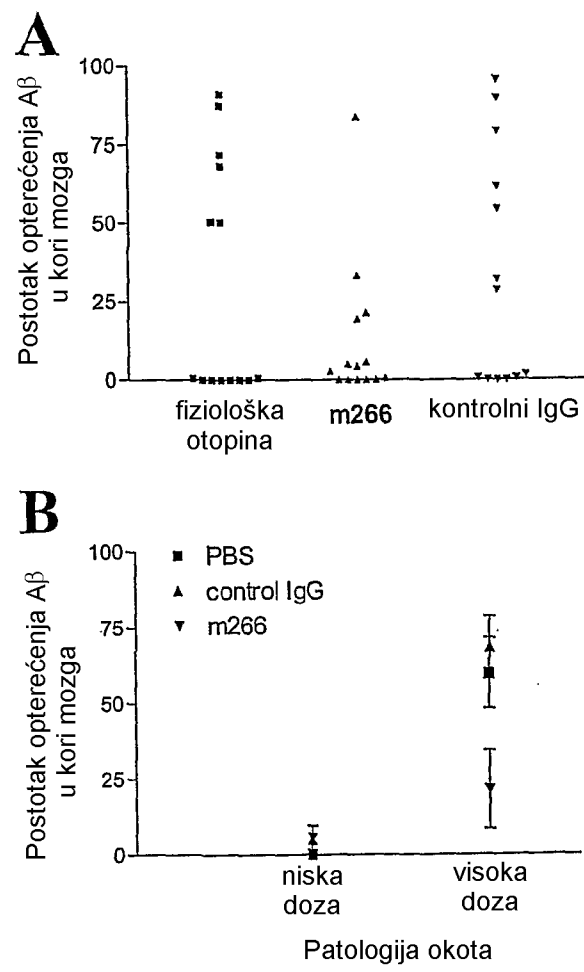
Slika 1

Postotak otklonjenog ukupnog A β 

Slika 2

A β u plazmi nakon injekcije 266 u venu miševa APP^{V717F}

Slika 3



Slika 4

Polinukleotidni slijed pVc-Hu266 za ekspresiju lakog lanca humaniziranog 266 i aminokiselinski slijed eksprimiranog lakog lanca humaniziranog 266 prikazan slovima.

```

619  ACGCGTCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTCCAGGTGTGATGTTGTGATG
      M K L P V R L L V L M F W I P A S R C D V V M

699  ACCCAGAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCAACCCTTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATATA
      T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L I Y

779  TAGTGATGGAAACGCCTATTACATTGGTTCTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA
      S D G N A Y L H W F L Q K P G Q S P R L L I Y K V S N

859  ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
      R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E

939  GCCGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTTCGGTCAAGGCACCAAGTGGAAAT
      A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I

1019 CAAACGTGAGTAGAATTTAATCTAGAAATCTAAACTCTGAGGGGGTCCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATT
      K R

1099 GAGTTTACTGCAAGGTTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAACTTT
      .

1179 ATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATT
      .

1259 ATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACACCCCAAGGGCAGAA
      .

1339 CTTTGTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
      T V A A P S V F I F P P S

1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
      D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W

1499 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
      K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L

1579 CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
      S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

1659 TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGC
      S S P V T K S F N R G E C •

1739 CTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCCTCCAGCTCATCTTT
      .

1819 CACCTCACCCCTCCTCCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAAATGAATAAAATAAGTGAATCTTTGCAC
      .

1899 CTGTGGTTTCTCTCTTTCCTCATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTATAAGGGACTAA
      .

1979 ATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCTTCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGAC
      .

2059 AGTCTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCAGAGTCCCCTGGGCCATGCTAGGAGAGACTTGCTTCTTGTGTTTCC
      .

2139 CCTCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTTAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATTTCCCTGAGA
      .

2219 ATCAACCAAAGCAAATTTTCAAAGAAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTCATTGCAACATGATATAAAATAACAAC
      .

2299 ACAATAAAAGCAATTAATAAAACAACAATAGGGAAATGTTAAGTTCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATG
      .

2379 CTTTATTTTACATTTTAAACAGGTAAGTCTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGATTGAGTACTTTCCACAACCTAATTT
      .

2459 AATCCACACTATACGTGAGATTAAAAACATTCATTAAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTC

```

Slika 4-nastavak

2539 TATAACTCAGCAATCCCACTTCTAGGATCC

Kompletni nukleotidni slijed gena lakog lanca Hu266 nalazi se između restrikcijskih mjesta MluI i BamHI u pVk-Hu266. Broj nukleotida označava njegov položaj u pVgk-Hu266. Egzoni Vk i Ck transliraju se u kodu prikazanom s po jednim slovom; točka pokazuje kodon za terminaciju translacije. Zreli teški lanac započinje na mjestu aspartatne kiseline (D) koja je dvostruko podcrtana. Intronski su slijedovi označeni italikom.

Slika 5

Polinukleotidni slijed pVg1-Hu266 za ekspresiju teškog lanca humaniziranog 266 i aminokiselinski slijed eksprimiranog teškog lanca humaniziranog 266 prikazan slovima.

```

519 ACGCGTCCACCATGAATTTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCTCTGTTTAAAGGTGCTCTGTGTGAAGTGCAGCTG
    M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E V Q L
699 GTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTAGTAG
    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 R
779 GTATTCCATGTCTTGGGTTTCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAATTGGTCGCACAAATTAATAGTGTGGTAATAGCA
    Y S M S W V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S
859 CCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCTGTACCTGCAATGAAC
    T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N
939 TCCCTGAGGGCCGAAGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCTGTGTACAGTCTC
    S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T L V T V S
1019 CTCAGGTGAGTCTCACAACCTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTA
    S
1099 AGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGT
1179 TAAGAACCAGGGGCGCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCGGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCCT
    A
1259 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
    S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
1339 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGC
    V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A
1419 TGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
    V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
1499 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTG
    I C N V N H K P S N T K V D K K V
1579 TCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGAACGATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCC
1659 CCGTCTGCCCTCTTCAACCGGAGGCTCTGCCCCCCCCACTCATGTCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCT
1739 CTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAG
1819 CCATATCCGGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGGCCACCCCAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTC
1899 TCTCTCCAGATTCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGAGAGCCCAAACTCTGTGACAAAACACACATGCCACCG
    E P K S C D K T H T C P P
1979 TGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACA
    C P
2059 GGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
    A P E L L G G P S V F L
2139 TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA
    F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
2219 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGT
    D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q
2299 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
    Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K
2379 GTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTTGGGGTGGCAGGGCC
    V S N K A L P A P I E K T I S K A K
2459 ACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCC
    G Q P
2539 CGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
    R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K
2619 AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG

```

Slika 5 - nastavak

G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P

2699 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F

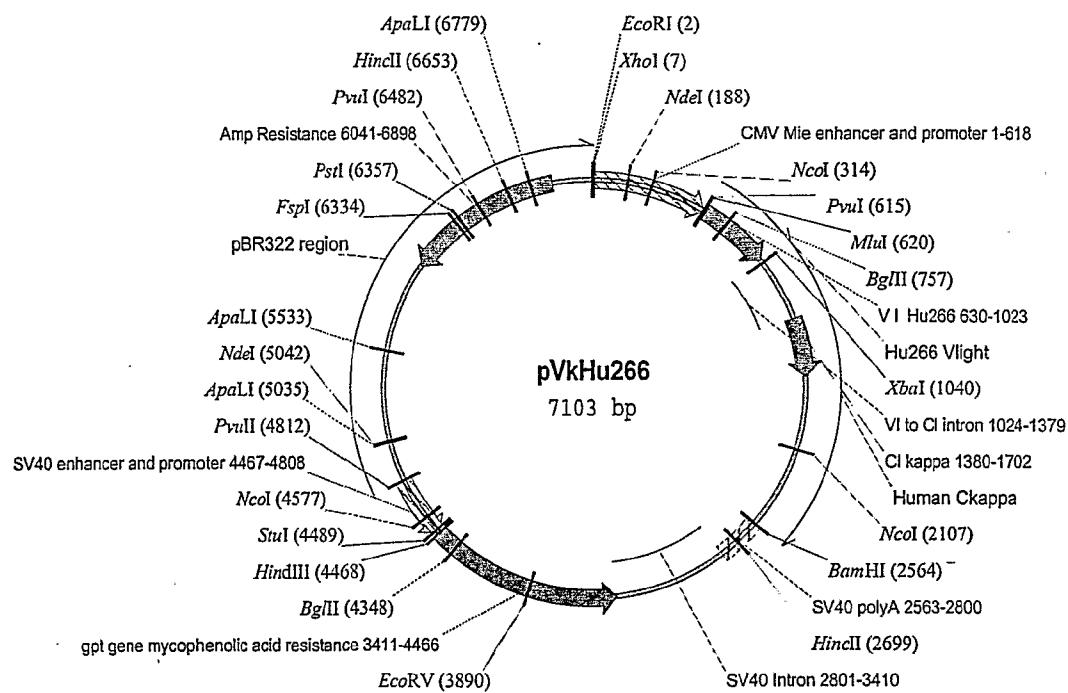
2779 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCG
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K •

2859 ACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGATGCTTGGCACGTACCCCCGTACATACTTCCCG
2939 GGC GCCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTCAGGC
3019 CGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGGCCCGAGGCTGTGCAGGTGTGC
3099 CTGGGCCCGCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGC
3179 AGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCCTGCCTCTGTAGGAGAC
3259 TGTCTCTTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTAGTCCATGTGCGTAGGGACAGG
3339 CCTCCCTCACCCATCTACCCCAACGGCACTAACCCCTGGCTGCCCTGCCAGCCTCGCACCCGCATGGGGACACAAACCG
3419 ACTCCGGGGACATGCACTCTCGGGCCCTGTGGAGGACTGGTGCAGATGCCACACACACACTCAGCCCAGACCCGTTCA
3499 ACAAAACCCGCACTGAGGTTGGCCGGCCACACGGCCACCACACACACACAGTGCACGCCTCACACACGGAGCCTCACCCGG
3579 GCGAACTGCACAGCACCCAGACCAGAGCAAGGTCTCTCGCACACGTGAACACTCCTCGGACACAGGCCCCCAGAGCCCCA
3659 CGCGGCACCTCAAGGCCCAAGGCCTCTCGGCAGCTTCTCCACATGCTGACCTGCTCAGACAAACCCAGCCCTCCTCTCA
3739 CAAGGGTGGCCCTGCAGCCGCCACACACACAGGGGATCACACACCACGTACGTCCCTGGCCCTGGCCCACTTCCAG
3819 TGCCGCCCTTCCCTGCAGGATCC

Kompletni nukleotidni slijed gena teškog lanca Hu266 nalazi se između restrikcijskih mjesta MluI i BamHI u pVg1-Hu266. Broj nukleotida označava njegov položaj u pVg1-Hu266. Eksoni VH i CH transliraju se u kodu prikazanom s po jednim slovom. Točka pokazuje kodon za terminaciju translacije. Zreli teški lanac započinje na mjestu glutaminske kiseline (E) koja je dvostruko podcrtana. Intronski su slijedovi označeni italicom.

Slika 6

Plazmid pVkJu266



Slika 7

Plazmid pVg1-Hu266

