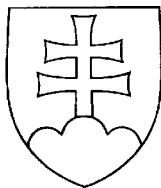


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **69-2008**
(22) Dátum podania prihlášky: **26. 2. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/254 498, 60/254 465, 60/184 601**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 12. 2000, 8. 12. 2000, 24. 2. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **7. 10. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **10/2003**
(45) Dátum oznámenia o udelení patentu: **7. 1. 2020**
Vestník ÚPV SR č.: **01/2020**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **13. 11. 2019**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vyľúčenej prihlášky: **1221-2002**
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US01/06191**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/62801**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

288723

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2020.01):

A61K 39/00
A61P 25/00

- (73) Majiteľ: **Washington University, St. Luis, MO, US;**
ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;
(72) Pôvodca: **Holtzman David M., St. Louis, MO, US;**
Demattos Ronald, St. Louis, MO, US;
Bales Kelly R., Cloverdale, IN, US;
Paul Steven M., Carmel, IN, US;
Tsurushita Naoya, Palo Alto, CA, US;
Vasquez Maximiliano, Palo Alto, CA, US;
(74) Zástupca: **TOMEŠ – Patentová a známková kancelária, s.r.o., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Farmaceutický prostriedok a použitie tohto farmaceutického prostriedku**

- (57) Anotácia:
Farmaceutický prostriedok obsahujúci humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý medzi aminokyselinami 13 až 28 peptidu Abeta (amyloidu beta), na použitie na prevenciu alebo liečbu predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby a prevenciu, liečbu alebo reverziu kognitívneho deficitu u subjektu, ktorému bola diagnostikovaná predklinická alebo klinická Alzheimerova choroba.

SK 288723 B6

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka farmaceutického prostriedku a použitia tohto farmaceutického prostriedku. Farmaceutický prostriedok obsahuje humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β . Použitie sleduje prevenciu alebo liečenie predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby.

Doterajší stav techniky

Mnoho stavov, ktoré vedú ku kognitívnym deficitom, mŕtviciam, mozgovému krvácaniu a celkovému mentálnemu zhoršeniu, je evidentne asociovaných s neurotickými a cerebrovaskulárnymi plakmi v mozgu, ktoré obsahujú amyloidový beta peptid (A β). Medzi takéto stavy patrí predklinická a klinická Alzheimerova choroba, Downov syndróm a predklinická a klinická cerebrálna amyloidová angiopatia (CAA). Amyloidové plaky sú tvorené z amyloidových beta peptidov. Tieto peptidy cirkulujú v krvi a v mozgovomiechovom moku (CSF), obvykle vo forme komplexov s lipoproteínmi. A β peptid v cirkulujúcej forme je zložený z 39 – 43 aminokyselín (najčastejšie zo 40 alebo 42 aminokyselín), ktoré vznikajú zo štiepenia spoločného prekursorového proteínu, amyloidového prekursorového proteínu, ktorý sa často označuje ako APP. Niektoré formy solubilného A sú samy osebe neurotoxicke a môžu určovať závažnosť neurodegenerácie a/alebo kognitívny deficit (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).

Dôkazy naznačujúce, že A môže byť transportované medzi mozgom a krvou (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). Ďalej, A β v plakoch je v rovnováhe so solubilným A β v mozgu a v krvi (Kawarabayashi T., et al., J. Neurosci. (2001)21:372-381).

Ako bolo opísané v PCT prihláške US 00/35681 a U.S. poradové č. 09/153,130, ktoré sú tu uvedené ako odkazy, celkové cirkulujúce hladiny A peptidu v CSF sú podobné u normálnych jedincov a u jedincov predisponovaných k príznakom Alzheimerovej choroby. Ale, hladiny A β 42 sú v priemere nižšie u jedincov s Alzheimerovou chorobou (Nitsch, R. M., et al., Ann. Neurol. (1995) 37:512-518). Je známe, že A β 42 je viac náchylný k agregácii ako A β 40, keď k tomu dôjde, vznikajú nežiaduce následky, ako je depozícia A β v amyloidových plakoch, konverzia A β na toxické solubilné formy, poškodenie nervových buniek a poruchy správania, ako je demencia (Golde, T. E., et al., Biochem. Biophys. Acta (2000) 1502:172-187).

Spôsoby indukcie imunitnej reakcie na redukciu amyloidových depozitov sú opísané v PCT publikácii WO 99/27944 publikovanej 10. 6. 1999. Prihláška uvádza, že kompletný agregovaný A β peptid môže byť užitočný imunogén. Imunogén. Podanie A β fragmentu (aminokyseliny 13-28) konjugovanej na ovčiu anti-myšiu IgG nespôsobuje žiadnu zmenu v ukladaní amyloidu v kortexe, a len pri jednom zvierati z deviatich, ktorým bol podaný konjugát A β 13-28 fragmentu, malo určitú lymfoprolifériáciu v reakcii na A β 40. Prihláška tiež naznačuje, že protilátky, ktoré sa špecificky viažu na A β peptid, môžu byť použité ako terapeutické činidlá. Ale, toto sa javí ako špekulácia, pretože dáta podporujúce túto hypotézu odrážajú protokoly, ktoré zahŕňajú aktívnu imunizáciu s použitím, napríklad A β 42. Peptidy sú podané pomocou adjuvans a sú určené titre protilátky indukované imunizáciou, rovnako ako koncentrácie A β peptidu a prekursorového peptidu. Prihláška silno naznačuje, že A β plak musí byť redukovaný na zmiernenie príznakov Alzheimerovej choroby a že na úspešnú redukciu A β plaku sú nutné procesy sprostredkované bunkami.

WO 99160024, publikovaná 25. 11. 1999, sa týka spôsobu odstránenie amyloidu s použitím anti-amyloidovej protilátky. Ale, je uvedené, že mechanizmus využíva schopnosti anti-A β protilátky viazať sa na preexistujúce amyloidové depozitá (t. j. plaky) a spôsobiť následnú lokálnu mikrogliálnu reakciu na lokalizovaných plakoch. Tento mechanizmus nebol overený *in vivo*. Táto prihláška ďalej uvádza, že aby boli účinné proti A β plakom, musia prenikať anti-A β protilátky do mozgového parenchýmu a prekonávať hematoencefalitickú bariéru.

Niekoľko PCT prihlášok, ktoré sa týkajú pokusov o kontrolu amyloidových plakov, bolo publikovaných 7. 12. 2000. WO 00/72880 opisuje významnú redukciu plakov v kortexe a hipokampe v transgénnom myšom modeli Alzheimerovej choroby pri liečbe N-terminálnych fragmentov A β peptidov a protilátok, ktoré sa viažu na tieto fragmenty, ale nie pri liečbe A β 13-28 fragmentom konjugovaným na ovčie anti-myšie IgG alebo pri použití protilátky proti 13-28 fragmentu, protilátky 266. Bolo zistené, že protilátky proti N-koncu prekonávajú hematoencefalitickú bariéru a indukujú fagocytózu amyloidových plakov v pokusoch *in vitro*.

WO 00/72876 opisuje v podstate to isté čo WO 00/72880 a týka sa imunizácie zložkami amyloidových fibril samotnými.

WO 00/77178 opisuje protilátky, ktoré katalyzujú hydrolyzu D-amyloidu, vrátane protilátok namierených proti zmesi fenyalanín-statinových prechodných zlúčenín Cys-A β 10-25 statín Phe19-Phe20 a Cys-A β 10-25 statín Phe20-Ala21 a protilátky proti A β 10-25 s redukovanou amidovou väzbou medzi Phe19 a Phe20. Táto prihláška

spomína sekvestrovanie A β , ale ide o špekuláciu, pretože nie je uvedený žiadny dôkaz takéhoto sekvestrovania. Ďalej, príhláška neuvádza žiadny dôkaz *in vivo*, že podanie protilátky spôsobuje vylučovanie A β z centrálného nervového systému, interferuje s tvorbou plakov, redukuje tvorbu plakov, tvorí komplexy medzi protilátkou a A β v tkanivách alebo ovplyvňuje kognitívne funkcie.

Bolo zistené, že jednou dráhou A β metabolizmu je transport z CNS do plazmy (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). Ďalej bolo zistené, že A β v plazme môže prenikať cez hematoencefalitickú bariéru a vstupovať do mozgu (Zlokovic, B. V., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67:1034-1040). Tiež bolo zistené, že podanie niektorých polyklonálnych a monoklonálnych A β protilátok znižuje deponovanie A β v amyloidových plakoch v APPV717F transgénnom myšom modeli Alzheimerovej choroby (Bard, F. et al., Nature Med. (2000) 6:916-919); ale uvádzalo sa, že toto je spôsobené tým, že niektoré anti-A β protilátky prechádzajúce hematoencefalickou bariérou stimulujú fagocytózu amyloidových plakov mikrogliami. V Bardových pokusoch testy na rezoch mozgu *ex vivo* ukázali, že prítomnosť A β protilátky, spoločne s exogénne pridanými mikrogliami, indukuje fagocytózu A β , čo vedie k odstráneniu A β depozitov.

Koncentrácie tak solubilného Aβ₄₀, ako Aβ₄₂ v CSF a krvi môžu byť ľahko zistené s použitím štandardných testov s použitím protilátky namierenej proti epitopom v Aβ reťazci. Takéto testy sú opísané, napríklad, v U.S. patentoch 5,766,846; 8,837,672 a 5,593,846. Tieto patenty opisujú produkciu vyššej monoklonálnej protilátky k centrálnej doméne Aβ peptidu, tá obsahuje epitopy okolo a vrátane pozícií 16 a 17. Tiež boli opísané protilátky namierené proti N-terminálnemu regiónu. Bolo zistené, že niektoré monoklonálne protilátky sú imunoreaktívne s pozíciami 13-28 Aβ peptidu; tieto sa neviažu na peptid obsahujúci pozície 17-28, a preto – podľa uvedených patentov – že tieto protilátky sa viažu na tento región, vrátane pozícií 16-17 (namiesto alfa-sekretázy). Medzi protilátky, o ktorých je známe, že sa viažu na región medzi aminokyselinami 13 a 28 Aβ, patria vyššie protilátky 266, 4G8 a 1C2.

Neocakávané sa zistilo, že podanie 266 protilátky veľmi rýchlo a takmer úplne obnovuje kognitívne funkcie (pamäť) 24-mesačných hemizygotných transgénnych myší (APP V717F). Ďalej, protilátka nemá vlastnosti, ktoré sa v odbore uvádzajú ako nutné na to, aby bola protilátka účinná pri liečbe Alzheimerovej choroby, Downovho syndrómu a iných ochorení súvisiacich s A β peptidom. Na prekvapenie sa pozorovalo, že protilátky, ktoré sa viažu na A β medzi pozíciami 13 a 28 (266 a 4G8), sú schopné sekvestrovať solubilné formy A β z viazaných, cirkulujúcich foriem v krvi, a že periférne podanie protilátky 266 vedie k rýchlemu vylučovaniu relatívne veľkých množstiev A β peptidu z CNS do plazmy. Toto vedie k zmene klirens solubilného A β , prevencii tvorby plakov, a – čo je najviac prekvapivé – k zlepšeniu kognitívnych funkcií, i bez nutnej redukcie A β amyloidových plakov, akéhokoľvek významného prekonávania hematoencefalitickej bariéry, väzby na plaky, aktivácie bunkových mechanizmov alebo väzby s vysokou afinitou na agregovaný A β .

Podstata vynálezu

Predmetom tohto vynálezu je farmaceutický prostriedok obsahujúci humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na použitie na prevenciu alebo liečbu predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

- CDR1 l'ahkého ret'azca:

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

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 l'ahkého ret'azca:

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

- CDR3 l'ahkého ret'azca:

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

a región úseku kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ľahkého reťazca, a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

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

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

– CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO: 6)

a sekvenciu úseku kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ťažkého reťazca.

Predmetom tohto vynálezu je ďalej farmaceutický prostriedok obsahujúci humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na použitie na prevenciu, liečbu alebo reverziu kognitívneho deficitu pri subjekte, ktorému bola diagnostikovaná predklinická alebo klinická Alzheimerova choroba, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľahkého reťazca:

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

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 ľahkého reťazca:

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

– CDR3 ľahkého reťazca:

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

a región úseku kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ľahkého reťazca a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

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

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

– CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO: 6)

a sekvenciu úseku kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ťažkého reťazca.

Výhodné uskutočnenie každého z farmaceutických prostriedkov na uvedené použitie spočíva v tom, že protilátka obsahuje CDR1 ľahkého reťazca:

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

CDR2 ťažkého reťazca:

5 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).

Výhodné uskutočnenie každého z farmaceutických prostriedkov na použitie uvedených skôr spočíva v tom, že humanizovaná protilátka obsahuje variabilný región ľahkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

10 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
15 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
20 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

25 Arg
(SEQ ID NO: 7),
kde

Xaa v pozícii 2 je Val alebo Ile;
Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Thr;
30 Xaa v pozícii 14 je Thr alebo Ser;
Xaa v pozícii 15 je Leu alebo Pro;
Xaa v pozícii 30 je Ile alebo Val;
Xaa v pozícii 50 je Agr, Gln alebo Lys;
Xaa v pozícii 88 je Val alebo Leu;
35 Xaa v pozícii 105 je Gln alebo Gly;
Xaa v pozícii 108 je Lys alebo Arg a
Xaa v pozícii 109 je Val alebo Leu;
a variabilný región ťažkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

40 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
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
50 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),
kde

55 Xaa v pozícii 1 je Glu alebo Gln;
Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Leu;
Xaa v pozícii 46 je Glu, Val, Asp alebo Ser;
Xaa v pozícii 63 je Thr alebo Ser;
Xaa v pozícii 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr;
60 Xaa v pozícii 76 je Lys alebo Arg;

Xaa v pozícii 86 je Gln alebo Asp a

Xaa v pozícii 107 je Leu alebo Thr.

Výhodné uskutočnenie použitia uvedeného farmaceutického prostriedku v protilátke, ktorá má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 9 a variabilného regiónu ťažkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 10.

Výhodné uskutočnenie uvedeného farmaceutického prostriedku spočíva v protilátke, ktorá má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 11 a variabilného regiónu ťažkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 12.

Predmetom tohto vynálezu je tiež použitie farmaceutického prostriedku obsahujúceho humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na výrobu liečiva na prevenciu alebo liečenie predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľahkého reťazca:

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

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 ľahkého reťazca:

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

– CDR3 ľahkého reťazca:

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

a región úseku kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ľahkého reťazca a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

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

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

– CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO: 6)

a sekvencie úseku kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ťažkého reťazca.

Predmetom tohto vynálezu je tiež použitie farmaceutického prostriedku obsahujúceho humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na výrobu liečiva na prevenciu, liečenie alebo reverziu kognitívneho deficitu pri subjekte, ktorému bola diagnostikovaná predklinická alebo klinická Alzheimerova choroba, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľahkého reťazca:

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

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 ľahkého reťazca:

1 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

5 (SEQ ID NO: 2) a

– CDR3 ľahkého reťazca:

1 5

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

(SEQ ID NO: 3),

10 a región úseku kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ľahkého reťazca a

b) ľažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľažkého reťazca:

1 5

15 Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO: 4)

– CDR2 ľažkého reťazca:

1 5 10 15

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

20 (SEQ ID NO: 5) alebo

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) a

– CDR3 ľažkého reťazca:

25 1

Gly Asp Tyr

(SEQ ID NO: 6)

a sekvencie úseku kostrovej oblasti ľažkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ľažkého reťazca.

Výhodným uskutočnením tohto vynálezu je farmaceutický prostriedok na použitie, kde protilátka obsahuje CDR1 ľahký reťazec:

30 1 5 10 15

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

(SEQ ID NO: 1) a

CDR2 ľažký reťazec:

35 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).

Výhodným uskutočnením tohto vynálezu je použitie vymedzeného farmaceutického prostriedku, kde humanizovaná protilátka obsahuje variabilný región ľahkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

40 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

45 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

50 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

55 (SEQ ID NO: 7),

kde

Xaa v pozícii 2 je Val alebo Ile;

Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Thr;

Xaa v pozícii 14 je Thr alebo Ser;

60 Xaa v pozícii 15 je Leu alebo Pro;

Xaa v pozícii 30 je Ile alebo Val;
 Xaa v pozícii 50 je Arg, Gln alebo Lys;
 Xaa v pozícii 88 je Val alebo Leu;
 Xaa v pozícii 105 je Gln alebo Gly;
 Xaa v pozícii 108 je Lys alebo Arg a
 Xaa v pozícii 109 je Val alebo Leu;

a variabilný región ťažkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

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),

kde

Xaa v pozícii 1 je Glu alebo Gln;

Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Leu;

Xaa v pozícii 46 je Glu, Val, Asp alebo Ser;

Xaa v pozícii 63 je Thr alebo Ser;

Xaa v pozícii 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr;

Xaa v pozícii 76 je Lys alebo Arg;

Xaa v pozícii 89 je Glu alebo Asp a Xaa v pozícii 107 je Leu alebo Thr.

Výhodným uskutočnením tohto vynálezu je použitie farmaceutického prostriedku uvedeného v predchádzajúcom odseku, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 9 a variabilného regiónu ťažkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 10.

Výhodným uskutočnením tohto vynálezu je použitie farmaceutického prostriedku uvedeného v ktoromkoľvek z uvedených odsekov, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 11 a variabilného regiónu ťažkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 12.

Ďalej sa opisuje predmetný vynález v širších súvislostiach. Sú tiež uvedené porovnávacie údaje.

Vynález poskytuje humanizované protilátky alebo ich fragmenty, ktoré pozitívne ovplyvňujú kognitívne funkcie pri chorobách asociovaných s Aβ, ako je klinická alebo predklinická Alzheimerova choroba, Downov syndróm a klinická alebo predklinická cerebrálna amyloidová angiopatia. Protilátky alebo ich fragmenty nemusia prenikať hematoencefalickou bariérou, viazať sa na amyloidové plaky, aktivovať bunkovú reakciu alebo redukovať amyloidové plaky. V inom aspekte predkladaný vynález poskytuje humanizované protilátky a ich fragmenty, ktoré sekvestrujú Aβ peptid z viazanej, cirkulujúcej formy v krvi, a menia klírens solubilných a viazaných foriem Aβ v centrálnom nervovom systéme a plazme. V inom aspekte predkladaný vynález poskytuje humanizované protilátky a ich fragmenty, kde humanizované protilátky sa špecificky viažu na epitop medzi aminokyselinami 13 a 28 Aβ molekuly. V inom aspekte vynález poskytuje humanizované protilátky a ich fragmenty, kde CDR sú odvodené od myšej monoklonálnej protilátky 266 a kde si protilátky približne zachovávajú väzbové vlastnosti myšej protilátky a majú *in vitro* a *in vivo* vlastnosti funkčne ekvivalentné myšej protilátke (sekvencia SEQ ID NO: 1 až SEQ ID NO: 6). V inom aspekte predkladaný vynález poskytuje humanizované protilátky a ich fragmenty, kde variabilné regióny majú sekvencie obsahujúce CDR z myšej protilátky 266 a špecifické ľudské pracovné sekvencie (sekvencia SEQ ID NO: 7 – SEQ ID NO: 10), kde si protilátky približne zachovávajú väzbové charakteristiky myšej protilátky a majú *in vitro* a *in vivo* vlastnosti funkčne ekvivalentné myšej protilátky 266. V inom aspekte predkladaný vynález poskytuje humanizované protilátky a ich fragmenty, kedy ľahký reťazec má SEQ ID NO: 11 a ťažký reťazec má SEQ ID NO: 12.

Súčasťou predkladaného vynálezu sú tiež polynukleotidové sekvencie, ktoré kódujú humanizované protilátky alebo ich fragmenty opísané skôr, vektory obsahujúce polynukleotidové sekvencie kódujúce humanizované protilátky alebo ich fragmenty, hostiteľské bunky transformované vektormi alebo inkorporujúce polynukleotidy, ktoré exprimujú humanizované protilátky alebo ich fragmenty, farmaceutické prípravky humanizovanej protilátky a ich fragmentov opísaných skôr, a spôsoby výroby a použitia týchto prípravkov.

Takéto humanizované protilátky a ich fragmenty sú použiteľné na sekvestrovanie A β u ľudí; na liečbu a prevenciu ochorení a stavov charakterizovaných A β plakmi alebo A β toxicitou v mozgu, ako je Alzheimerova choroba, Downov syndróm a cerebrálna amyloidová angiopatia u človeka; na diagnostiku týchto ochorení u človeka; a na určenie toho, či bude ľudský jedinec odpovedať na liečbu ľudskou protilátkou proti A β .

Podanie vhodnej humanizovanej protilátky *in vivo* pre sekvestráciu A β peptidu cirkulujúceho v biologických tekutinách je použiteľné na preventívnu a terapeutickú liečbu stavov spojených s tvorbou difúzných, neurotických a cerebrovaskulárných plakov obsahujúcich A β v mozgu. Humanizované protilátky, vrátane ich imunologicky reaktívnych fragmentov, spôsobujú odstránenie A β peptidu z makromolekulárných komplexov, ktoré sa normálne podieľajú na ich transporte v telesných tekutinách do a z miest, v ktorých môžu byť tvorené plaky alebo kde môžu byť toxické. Ďalej, sekvestrovanie plazmatického A β peptidu pomocou protilátky alebo jej fragmentu pôsobí ako „jamka“, ktorá účinne sekvestruje solubilný A β peptid v plazmatickom kompartmente a indukuje presun A β do plazmy z regiónov v centrálnom nervovom systéme (CNS). Sekvestrovaním A β v krvi sa zvyšuje vylučovanie A β z mozgu a bráni sa ukladaniu solubilného A β v insolubilných plakoch a tvorbe toxických solubilných typov A β v mozgu. Ďalej, insolubilný A β v plakoch, ktorý je v rovnováhe so solubilným A β , môže byť odstránený z mozgu prostredníctvom sekvestrácie v krvi. Sekvestrovaním A β peptidu pomocou protilátky tiež zvyšuje jeho vylučovanie a inhibuje toxické účinky solubilného A β v mozgu a vznik a ďalšiu akumuláciu insolubilného A β vo forme amyloidu v plakoch. Protilátky podľa predkladaného vynálezu neprenikajú hematoencefalickou bariérou vo veľkých množstvách (0,1 % plazmatickej koncentrácie). Ďalej, humanizované protilátky podľa predkladaného vynálezu nemusia pri periférnom podaní na dosiahnutie účinku vyvolávať bunkovú imunitnú reakciu v mozgu alebo cirkuláciu pri väzbe na A β peptid. Ďalej, pri periférnom podaní sa nemusí na dosiahnutie účinku viazať na agregovaný A β peptid v mozgu.

Tak je v jednom aspekte vynález zameraný na spôsob liečby a na prevenciu stavov charakterizovaných tvorbou plakov obsahujúcich beta-amyloidový proteín u človeka, kde tento spôsob zahŕňa podanie, výhodne periférne, terapeuticky alebo profylakticky účinného množstva humanizovanej monoklonálnej protilátky alebo jej imunologicky reaktívneho fragmentu, kde táto protilátka sa špecificky viaže na stredný región A β peptidu. V inom aspekte je vynález zameraný na spôsob inhibície tvorby amyloidových plakov a na odstránenie amyloidových plakov u človeka, kde tento spôsob zahŕňa podanie účinného množstva humanizovanej protilátky, ktorá sekvestruje A β peptid z cirkulujúcej formy v krvi a indukuje vylučovanie peptidu z mozgu, rovnako ako mení A β klírens v plazme a mozgu, človeku, ktorý potrebuje takúto inhibíciu. V ďalších aspektoch je vynález zameraný na takéto humanizované protilátky, vrátane ich imunologicky účinných častí a na spôsoby ich prípravy.

Vynález sa tiež týka spôsobov na zastavenie zhoršovania kognitívnych funkcií, zlepšenie kognitívnych funkcií, liečbu zhoršenia kognitívnych funkcií a prevenciu zhoršenia kognitívnych funkcií u jedinca s diagnostikovanou klinickou alebo predklinickou Alzheimerovou chorobou, Downovým syndrómom alebo klinickou alebo predklinickou cerebrálnou amyloidovou angiopatiou, ktorá zahŕňa podanie účinného množstva humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu danému jedincovi.

Vynález tiež zahŕňa použitie humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu na výrobu liečiva, vrátane dlhodobej exprese rekombinantnej sekvencie protilátky alebo protilátkového fragmentu v ľudských tkanivách, na liečbu, prevenciu alebo reverziu Alzheimerovej choroby, Downovho syndrómu alebo cerebrálnej amyloidovej angiopatie; na liečbu, prevenciu alebo reverziu zhoršovania kognitívnych funkcií pri klinickej alebo predklinickej cerebrálnej amyloidovej angiopatie; alebo na inhibíciu tvorby amyloidových plakov, alebo pôsobenie toxických solubilných typov A β u človeka.

Vynález sa týka prekvapivého zistenia, že v priebehu krátkeho času po podaní protilátky podľa predkladaného vynálezu dôjde k vylúčeniu relatívne veľkých množstiev A β z centrálneho nervového systému do krvi. Preto predkladaný vynález zahŕňa spôsoby na hodnotenie odpovede ľudského jedinca na liečbu protilátkou, ktorá sa viaže na A β alebo jeho fragment, ktoré zahŕňa: a) podanie protilátky alebo jej fragmentu jedincovi a b) meranie koncentrácie A β v krvi jedinca.

Vynález tiež zahŕňa spôsob liečby ľudského jedinca protilátkou, ktorá sa viaže na A β alebo jeho fragment, ktorý zahŕňa: a) podanie prvej dávky protilátky alebo jej fragmentu jedincovi; b) v priebehu 3 hodín až 2 týždňov po podaní prvej dávky meranie koncentrácie A β v krvi jedinca; c) pokiaľ je to nutné, vypočítanie druhej dávky protilátky alebo jej fragmentu podľa výsledkov z kroku b), kde druhá dávka je rovnaká alebo iná ako prvá dávka a d) podanie druhej dávky protilátky alebo jej fragmentu.

Vynález tiež zahŕňa spôsob hodnotenia účinnosti protilátky, ktorá sa viaže na A β alebo jeho fragment, v inhibícii alebo prevencii tvorby A β amyloidových plakov, v redukcii A β amyloidových plakov, v redukcii účinkov toxických solubilných typov A β alebo v liečbe stavov a ochorení asociovaných s A β plakmi, u človeka, ktorý zahŕňa: a) získanie prvej vzorky plazmy alebo CSF jedinca; b) meranie základnej koncentrácie A β v prvej vzorke; c) podanie protilátky alebo jej fragmentu jedincovi; d) v priebehu 3 hodín až 2 týždňov po podaní protilátky alebo jej fragmentu získanie druhej vzorky plazmy alebo CSF jedinca a e) meranie koncentrácie A β v druhej vzorke; kde účinnosť je hodnotená podľa množstva A β naviazaného na protilátku v krvi a podľa koncentrácie A β v CSF.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 ukazuje percento A β peptidu v ľudskom mozgovomiechovom moku, ktorý sa získa cez dialyzačnú membránu pomocou MAb 266 v závislosti od hraničnej hodnoty molekulovej hmotnosti dialyzačnej membrány.

Obr. 2 ukazuje koncentrácie A β Total v plazme APP^{V717F} transgénnych myší po injekcii buď 200 μ g, alebo 600 μ g MAb 266 v závislosti od času.

Obr. 3A ukazuje množstvo uloženého A β peptidu v kortexe APP^{C717F} transgénnych myší liečených salinickým roztokom, myším IgG alebo MAb 266. Obr. 3B ukazuje koreláciu týchto výsledkov s pôvodom.

Obr. 4 ukazuje polynukleotidové sekvencie na expresiu humanizovaného 266 ľahkého reťazca z plazmidu pVk-Hu266 a jednotlivé aminokyseliny kódované v exprimovanom humanizovanom 266 ľahkom reťazci (čo zodpovedá SEQ ID NO: 11 v zrelom stave). Je tu znázornený pVk-Hu266 polynukleotidovej sekvencie na expresiu humanizovaného 266 ľahkého reťazca, s kódmi jednotlivých aminokyselín pre exprimovaný humanizovaný 266 ľahký reťazec; kompletná sekvencia génu pre ľahký reťazec Hu266 je lokalizovaná medzi MluI a BamHI miestami v pVk-Hu266. V_K a C_K exóny sú translatované do jednopísmenového kódu; bodky ukazujú translačný terminálny kód. Zrelý ľahký reťazec začína dvojito podtrhnutou kyselinou asparágovou (D) a iónové sekvencie sú značené kurzívou.

Obr. 5 ukazuje polynukleotidové sekvencie na expresiu humanizovaného 266 ťažkého reťazca z plazmidu pVg1-Hu266 a jednotlivé aminokyseliny kódované v exprimovanom humanizovanom 266 ťažkom reťazci (čo zodpovedá SEQ ID NO: 12 v zrelom stave). Je tu znázornený pVg1-Hu266 polynukleotidovej sekvencie pre expresiu humanizovaného 266 ťažkého reťazca, s kódmi jednotlivých aminokyselín pre exprimovaný humanizovaný 266 ťažký reťazec; kompletná sekvencia génu pre ťažký reťazec Hu266 je lokalizovaná medzi MluI a BamHI miestami v pVg1-Hu266. V_H a C_H exóny sú translatované do jednopísmenového kódu; bodky ukazujú translačný terminálny kód. Zrelý ťažký reťazec začína dvojito podtrhnutou kyselinou glutámovou (E) a iónové sekvencie sú značené kurzívou.

Obr. 6 je mapa plazmidu pVk-Hu266.

Obr. 7 je mapa plazmidu pVg1-Hu266.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Spôsoby uskutočnenia vynálezu

A β peptidy, ktoré cirkulujú v biologických kvapalinách, predstavujú karboxy terminálny región prekurzorového proteínu kódovaného na chromozóme 21. Z výsledkov pokusov *in vitro* bolo opísané, že A β peptid má zľú rozpustnosť vo fyziologických roztokoch, pretože obsahuje reťazec hydrofóbných aminokyselín, ktoré sú súčasťou regiónu, ktorý zakotvuje jeho ďalší prekurzor do bunkových lipidových membrán. Preto nie je prekvapivé, že cirkulujúci A β peptid je za normálnych okolností v komplexe s inými skupinami, ktoré bránia jeho agregácii. Toto spôsobuje obtiaže pri detekcii cirkulujúcich A β peptidov v biologických kvapalinách.

Uvedené patenty (U. S. patenty 5,766,846; 5,837,672 a 5,593,846) opisujú prípravu protilátky, vrátane monoklonálnej protilátky, označenej ako klon 266, ktorá je namierená k a špecificky sa viaže na peptid obsahujúci aminokyseliny 13-28 A β peptidu. Predkladatelia vynálezu zistili, že protilátky, ktoré sa viažu na tento región, oproti protilátkam, ktoré sa viažu na akékoľvek iné miesto aminokyselinovej sekvencie A β , sú schopné veľmi účinne sekvestrovať solubilný A β peptid z makromolekulových komplexov. Táto sekvestrácia spôsobuje vylučovanie A β peptidu z CNS, mení jeho klírens v CNS a plazme, a redukuje jeho schopnosť tvoriť plaky. Preto sú protilátky s touto špecifitou modifikované tak, aby bola znížená ich imunogenita pomocou premeny na humanizované formy, možnou liečbou – tak profylaktickou, ako terapeutickou, stavov spojených s tvorbou beta-amyloidových plakov. Medzi takého stavu patrí, ako bolo uvedené, predklinická a klinická cerebrálna amyloidová angiopatia.

Termín „liečba“, ako je tu použitý, zahŕňa terapeutickú liečbu, pri ktorej už existuje liečené ochorenie, rovnako ako profylaktickú liečbu – t. j. prevenciu alebo zmiernenie možného budúceho ochorenia.

Termín „monoklonálne protilátky, ktoré sa viažu na stredný región A β peptidu“, označuje monoklonálne protilátky (MAb alebo MABs), ktoré sa viažu na aminokyselinovú sekvenciu predstavujúcu epitop obsiahnutý medzi pozíciami 13-28 A β . Nemusí pokryť celý región. Pokiaľ sa protilátka viaže na aspoň epitop v tomto regióne (predovšetkým vrátane miesta pre x-sekretázu 16-17 alebo miesta, na ktoré sa viaže protilátka 266), tak je protilátka účinná v spôsobe podľa predkladaného vynálezu.

Termín „protilátka“ označuje monoklonálnu protilátku samu osebe, alebo jej imunologický účinný fragment, ako je F(A β), F(A β)' alebo F(A β)'2 fragmentu. V niektorých kontextoch sú fragmenty špecificky uvedené; ale, je potrebné si uvedomiť, že bez ohľadu na to, či sú uvedené fragmenty, zahŕňa termín „protilátka“ takéto fragmenty, rovnako ako jednoreťazcové formy. Pokiaľ si proteín zachováva schopnosť špecifickej väzby pre zameraný cieľ, a v tomto prípade schopnosť sekvestrácie A β peptidu z proteínových nosičov v krvi, je zahr-

nutý v termíne „protilátka“. Termín „protilátka“ tiež zahŕňa, napríklad jednoreťazcové formy, obvykle označované ako Fv regióny, protilátky s touto špecificitou. Výhodne, ale nie nutne, sú protilátky použiteľné v predkladanom vynáleze produkované rekombinantne, pretože pri úprave typickej myšej alebo inej non-ludskej protilátky s vhodnou špecificitou je nutná jej premena na humanizovanú formu. Protilátky môžu a nemusia byť glykozylované, hoci glykozylované protilátky sú výhodné. Protilátky sú správne zosieťované prostredníctvom disulfidových väzieb, ako je dobre známe v odbore.

Je známe, že základná štruktúra jednotka protilátky je tvorená tetrametrom. Každý tetrameter je tvorený dvoma identickými pámi polypeptidových reťazcov, kde každý pár je tvorený jedným „ľahkým“ (približne 25 kDa) a jedným „ťažkým“ reťazcom (približne 50 – 70 kDa). Amino-koncová časť každého reťazca obsahuje variabilný región veľkosti približne 100 až 110 alebo viac aminokyselín primárne zodpovedný za rozpoznanie antigénu. Karboxy-koncová časť každého reťazca definuje konštantný región primárne zodpovedný za efektorové funkcie.

Ľahké reťazce sa delia na gamma, mu, alfa a lambda. Ťažké reťazce sa delia na gamma, mu, alfa, delta a epsilon a definujú izotyp protilátky, ako IgG, IgM, IgA, IgD a IgE, v príslušnom poradí. V ľahkých a ťažkých reťazcoch sú variabilné a konštantné regióny spojené „J“ regiónom tvoreným približne 12 alebo viac aminokyselinami, kde ťažký reťazec tiež obsahuje „T“ región tvorený približne 10 ďalšími aminokyselinami.

Variabilné regióny každého ľahkého/ťažkého páru reťazcov tvoria väzbové miesta protilátky. Preto má intaktná protilátka dve väzbové miesta. Reťazce majú rovnakú všeobecnú štruktúru tvorenú dvoma relatívne konzervovanými pracovnými regiónmi (FR) spojenými tromi hypervariabilnými regiónmi, ktoré sa tiež označujú ako regióny určujúce komplementaritu alebo CDR. CDR z dvoch reťazcov každého páru sú usporiadané pomocou pracovných regiónov, čo umožňuje väzbu na špecifický epitop. Od N-konca k C-koncu obsahujú tak ľahký, ako ťažký reťazec domény FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 a FR4. Priradenie aminokyselín ku každej doméne je v súlade s dobre známou konvenciou (Kabat „Sequences of Proteins of immunological interest“ National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 a 1991; Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia, et al., Nature 342:878-883 (1989)).

Ako je v odbore známe, môžu byť monoklonálne protilátky ľahko pripravené s vhodnou špecificitou s použitím štandardných techník imunizácie cicavcov, prípravy hybridómov z buniek produkujúcich protilátky od uvedených cicavcov a kultiváciou hybridómov alebo immortalizovaných buniek na hodnotenie ich špecificity. V tomto prípade môžu byť protilátky pripravené imunizáciou človeka, kráľika, krysy alebo myši peptidom reprezentujúcim epitop obsahujúci 13-28 región Aβ peptidu alebo jeho vhodný subregión. Materiály na rekombinantnú úpravu môžu byť získané získaním nukleotidovej sekvencie kódujúcej požadovanú protilátku z hybridómu alebo iných buniek, ktoré ju produkujú, táto nukleotidová sekvencia za získania nukleotidu v humanizovanej forme.

Termín „humanizovaná protilátka“ označuje protilátku, ktorá je zložená čiastočne alebo úplne z aminokyselinovej sekvencie odvodennej od ľudskej protilátky pozmenením sekvencie protilátky majúcej non-ludské regióny určujúce komplementaritu (CDR). Najjednoduchšia alterácia môže spočívať v substitúcii konštantného regiónu ľudskej protilátky za myšiu konštantný región, za vzniku ľudskej/myšej chiméry, ktorá môže mať dostatočne nízku imunogenicitu pre to, aby bola prijateľná na farmaceutické použitie. Výhodne sú variabilný región protilátky a i CDR tiež humanizované s použitím techník, ktoré sú dobre známe v odbore. Pracovné regióny variabilných regiónov sú substituované príslušnými ľudskými pracovnými regiónmi s ponechaním non-ludských CDR v podstate bezo zmien alebo nahradením CDR sekvenciou odvodenou z ľudského genómu. Úplne ľudské protilátky sú produkované geneticky modifikovanými myšami, ktorých imunitné systémy boli pozmenené tak, aby zodpovedali ľudským imunitným systémom. Ako bolo uvedené, je v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu dostačujúce použitie imunologicky špecifického fragmentu protilátky, vrátane fragmentov reprezentujúcich jednoreťazcové formy.

Humanizovaná protilátka opäť označuje protilátku obsahujúcu ľudský pracovný región, aspoň jeden CDR z non-ludskej protilátky, a v ktorej akýkoľvek prítomný konštantný región je v podstate identický s ľudským imunoglobulínovým konštantným regiónom, t. j. aspoň približne z 85 – 90 %, výhodne aspoň z 95 % identický. Preto sú všetky časti humanizovanej protilátky, s výnimkou CDR, v podstate identické s príslušnými časťami jednej alebo viacerých prirodzených ľudských imunoglobulínových sekvencií. Napríklad, humanizovaný imunoglobulín obvykle neoznačuje protilátku tvorenú chimérickým myším variabilným regiónom/ľudským konštantným regiónom.

Humanizované protilátky majú aspoň tri potenciálne výhody pred non-ludskými a chimérickými protilátkami pri použití v ľudskej terapii:

1. Vzhľadom na to, že efektorová časť je ľudská, môžu lepšie interagovať s ľudským imunitným systémom (napríklad účinnejšie likvidovať cieľové bunky pomocou cytotoxicity závislej od komplementu (CDC) alebo bunkovej cytotoxicity závislej od protilátok (ADCC)).

2. Ľudský imunitný systém by nemal rozpoznávať pracovný región alebo C región humanizovanej protilátky ako cudzí, a preto by protilátková reakcia proti takejto injikovanej protilátke mala byť menšia ako proti úplne cudzorodej non-ludskej protilátke alebo a čiastočne cudzorodej chimérickej protilátke.

3. Bolo opísané, že injikované non-lidské protilátky majú polčas v ľudskej cirkulácii omnoho kratší, ako je polčas ľudských protilátok. Injekované humanizované protilátky budú mať polčas v podstate identický ako prirodzené ľudské protilátky, čo umožní podanie nižších dávok a menej často.

Návrh humanizovaných imunoglobulínov môže byť uskutočnený nasledujúcim spôsobom. Keď spadá aminokyselina do nasledujúcej kategórie, tak môže byť aminokyselina pracovného rámca ľudského imunoglobulínu (akceptorového imunoglobulínu) nahradená aminokyselinou pracovného regiónu z non-lidského imunoglobulínu poskytujúceho CDR (donorového imunoglobulínu):

(a) aminokyselina v ľudskom pracovnom regióne akceptorového imunoglobulínu je neobvyklá pre ľudský imunoglobulín v tejto pozícii, zatiaľ čo zodpovedajúca aminokyselina v donorovom imunoglobulíne je typická pre ľudský imunoglobulín v tejto pozícii;

(b) pozícia aminokyseliny je bezprostredne susediaca s jedným z CDR; alebo

(c) akýkoľvek atóm vedľajšieho reťazca pracovnej aminokyseliny je vo vzdialenosti približne 5-6 angstromov (centrum-centrum) od akéhokoľvek atómu CDR aminokyseliny v trojrozmernom modeli imunoglobulínov (Queen, et. al., op. cit., a co, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)). Keď je každá aminokyselina v ľudskom pracovnom regióne akceptorového imunoglobulínu a príslušná aminokyselina v donorovom imunoglobulíne neobvyklá pre ľudský imunoglobulín v tejto pozícii, tak je aminokyselina nahradená aminokyselinou typickou pre ľudský imunoglobulín v tejto pozícii.

Výhodná humanizovaná protilátka je humanizovaná forma vyššej protilátky 266. CDR humanizované 266 majú nasledujúce aminokyselinové sekvencie:

ľahký reťazec CDR1:

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

ľahký reťazec CDR2:

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

ľahký reťazec CDR3:

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

ťažký reťazec CDR1:

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

ťažký reťazec CDR2:

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)

a ťažký reťazec CDR3:

1
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).

Výhodný variabilný región ľahkého reťazca humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu má nasledujúcu aminokyselinovú sekvenciu, v ktorej pracovný región pochádza z ľudských V κ segmentov DPK18 a J segmentu J κ 1, s niekoľkými aminokyselinovými substitúciami na konvenčné aminokyseliny v rovnakej ľudskej V podskupine na redukciu potenciálnej imunogenicity:

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),

kde:

- Xaa v pozícii 2 je Val alebo Ile;
 Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Thr;
 Xaa v pozícii 14 je Thr alebo Ser;
 Xaa v pozícii 15 je Leu alebo Pro;
- 5 Xaa v pozícii 30 je Ile alebo Val;
 Xaa v pozícii 50 je Arg, Gln alebo Lys;
 Xaa v pozícii 88 je Val alebo Leu;
 Xaa v pozícii 105 je Gln alebo Gly;
 Xaa v pozícii 108 je Lys alebo Arg a
- 10 Xaa v pozícii 109 je Val alebo Leu.
- Výhodný variabilný región ťažkého reťazca humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu má nasledujúcu aminokyselinovú sekvenciu, v ktorej pracovný región pochádza z ľudských VH segmentov DP53 a J segmentu JH4, s niekoľkými aminokyselinovými substitúciami na konvenčné aminokyseliny v rovnakej ľudskej V podskupine na redukcii potenciálnej imunogenicity:
- 15 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
 20 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
- 25 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
- 30 Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:8),
 kde:
 Xaa v pozícii 1 je Glu alebo Gln;
 Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Leu;
 Xaa v pozícii 46 je Gln, Val, Asp alebo Ser;
- 35 Xaa v pozícii 63 je Thr alebo Ser;
 Xaa v pozícii 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr;
 Xaa v pozícii 76 je Lys alebo Mg;
 Xaa v pozícii 89 je Glu alebo Asp a
 Xaa v pozícii 107 je Leu alebo Thr.
- 40 Predovšetkým výhodný variabilný región ľahkého reťazca humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu má nasledujúcu aminokyselinovú sekvenciu, v ktorej pracovný región pochádza z ľudských V_κ segmentov DPK18 a J segmentu J_κ1, s niekoľkými aminokyselinovými substitúciami na konvenčné aminokyseliny v rovnakej ľudskej V podskupine na redukcii potenciálnej imunogenicity:
- 1 5 10 15
 45 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 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
 55 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).

Predovšetkým výhodný variabilný región ťažkého reťazca humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu má nasledujúcu aminokyselinovú sekvenciu, v ktorej pracovný región pochádza z ľudských VH segmentov DP53 a J segmentu JH4.

1	5	10	15
5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	20	25
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	35	40
	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	50	55
10	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr	65	70
	Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala	80	85
15	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Ileu Arg Ala Glu Asp	95	100
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	110	
20	Thr Ala Val Thr Val Ser Ser	(SEQ ID NO: 10).	

Výhodný ľahký reťazec pre humanizované protilátky podľa predkladaného vynálezu má aminokyselinovú sekvenciu:

1	5	10	15
25	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu	20	25
	Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gln Ser Leu Ile	35	40
	Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro	50	55
30	Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	65	70
	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	80	85
35	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val	95	100
	Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln	110	115
	Gly Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val	125	130
40	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala	140	145
	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	155	160
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	170	175
45	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	185	190
	Ser Ser Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	200	205
50	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).	

Výhodný ťažký reťazec pre humanizované protilátky podľa predkladaného vynálezu má aminokyselinovú sekvenciu:

1	5	10	15
55	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	20	25
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	35	40
60	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
 5 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
 10 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
 15 155 160 165
 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
 20 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
 25 230 235 240
 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
 30 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
 35 305 310 315
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 320 325 330
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 335 340 345
 40 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 350 355 360
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 365 370 375
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 45 380 385 390
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Lys Thr Thr Pro
 395 400 405
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 410 415 420
 50 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 425 430 435
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 440
 55 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO: 12).

Pre ľahké a ťažké reťazce humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu a pre humanizovanú
 266 sú možné i iné sekvencie. Imunoglobulíny môžu obsahovať dva páry komplexov ľahký reťazec/ťažký
 reťazec, kde aspoň reťazec obsahuje jeden alebo viac myších regiónov určujúcich komplementaritu funkčne
 naviazaných na segmenty ľudského pracovného regiónu.

60 V inom aspekte sa predkladajú vynález týka rekombinantných polynukleotidov kódujúcich protilátky,
 ktoré – po expresii – obsahujú CDR ťažkého a ľahkého reťazca z protilátky podľa predkladaného vynálezu.

Rovnako ako pre ľudský pracovný región je aminokyselinová sekvencia pracovného alebo variabilného non-ľudského imunoglobulínu poskytujúceho CDR porovnávaná so zodpovedajúcimi sekvenciami v knižnici variabilných regiónov ľudského imunoglobulínu a je vybraná sekvencia majúca najvyššie percento identických s aminokyselinami. Príklady polynukleotidov, ktoré kódujú polypeptidové reťazce obsahujúce CDR pre ťažký a ľahký reťazec monoklonálnej protilátky 266, sú uvedené na obr. 4 a 5. V dôsledku degenerácie kodónov a nekritických aminokyselinových substitúcií môžu byť za tieto polynukleotidové sekvencie zamenené iné sekvencie. Predovšetkým výhodné polynukleotidy podľa predkladaného vynálezu kódujú protilátky, ktoré – po expresii – obsahujú CDR SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 6, alebo akékoľvek variabilné regióny SEQ ID NO: 7 – SEQ ID NO: 10, alebo ľahký a ťažký reťazec SEQ ID NO: 11 a SEQ ID NO: 12.

Polynukleotidy budú obvykle ďalej obsahovať polynukleotidové sekvencie riadiace expresiu operatívne naviazané na sekvencie kódujúce humanizovaný imunoglobulín, vrátane prirodzene asociovaných či heterológnych promótorových regiónov. Výhodne sú sekvencie riadiace expresiu eukaryotické promótorové systémy vo vektoroch schopných transformovať alebo transfekovať eukaryotické hostiteľské bunky, ale môžu byť použité tiež riadiace sekvencie pre prokaryotické hostiteľské bunky. Po inkorporácii vektora do vhodnej hostiteľskej bunkovej línie sa hostiteľské bunky propagujú za podmienok vhodných pre vysokú expresiu nukleotidovej sekvencie, a pokiaľ je to žiaduce, môže byť potom uskutočnený odber a prečistenie ľahkých reťazcov, ťažkých reťazcov, dimérov ľahký/ťažký reťazec alebo intaktné protilátky, ich väzbových fragmentov alebo iných foriem imunoglobulínov.

Nukleotidové sekvencie podľa predkladaného vynálezu schopné exprimovať požadované humanizované protilátky môžu byť pripravené z mnohých rôznych polynukleotidov (genómovej alebo cDNA, RNA, syntetických oligonukleotidov atď.) a zložiek (napr. V, J, D a C regiónov), rovnako ako s použitím rôznych techník. Spojenie vhodnej genómovej a syntetickej sekvencie je bežným spôsobom produkcie, ale môžu byť tiež použité cDNA sekvencie.

DNA sekvencie ľudského konštantného regiónu môžu byť izolované s použitím dobre známych techník z rôznych ľudských buniek, ale výhodne z immortalizovaných B-lymfocytov. CDR na produkciu imunoglobulínov podľa predkladaného vynálezu budú obdobne odvodené z non-ľudskej monoklonálnej protilátky viažucej sa na epitop medzi aminokyselinami 13 a 28 A β peptidu, kde tieto monoklonálne protilátky sú produkovvané v akomkoľvek vhodnom cicavčom zdroji, vrátane myši, králikov alebo iných stavovcov schopných produkovať protilátky dobre známymi spôsobmi, ako je opísané. Vhodnými zdrojovými bunkami pre polynukleotidové sekvencie a hostiteľskými bunkami pre expresiu a sekréciu imunoglobulínov sú bunky známe v odbore.

Okrem humanizovaných imunoglobulínov, ktoré boli opísané, môžu byť ľahko pripravené a vyrobené „v podstate homológne“ modifikované imunoglobulíny, s použitím rôznych rekombinantných DNA techník dobre známych odborníkom v odbore. Napríklad, pracovné regióny sa môžu líšiť od prirodzenej sekvencie v štruktúre primárnej sekvencie niekoľkými aminokyselinovými substitúciami, terminálnymi a intermediárnymi adíciami a deláciami, a podobne. Ďalej, rôzne ľudské pracovné regióny môžu byť použité samostatne alebo v kombinácii ako základ pre humanizované imunoglobulíny podľa predkladaného vynálezu. Všeobecne, modifikácia génu môže byť ľahko uskutočnená s použitím rôznych dobre známych techník, ako je miestne cielená mutagenéza.

Alternatívne môžu byť pripravené polypeptidové fragmenty obsahujúce len časť primárnej protilátky, kde tieto fragmenty majú jednu alebo viac aktivít imunoglobulínu (napr. fixáciu komplementu). Tieto polypeptidové fragmenty môžu byť produkovvané proteolytickým štiepením intaktnej protilátky s použitím spôsobov dobre známych v odbore, alebo inzerciou stop kodónov v požadovaných pozíciách do vektorov s použitím miestne cielennej mutagenézy, napríklad za CH1, čo vedie k produkcii FA β fragmentov alebo za pantový región, čo vedie k produkcii F(A β)₂ fragmentov. Jednoreťazcové protilátky môžu byť produkovvané spojením VL a VH s použitím DNA linkeru.

Ako bolo uvedené, kódujúca nukleotidová sekvencia bude exprimovaná v hostiteľoch po operatívnom naviazaní sekvencie na (t. j. umiestnenie zaisťujúcom jej funkciu) sekvenciu riadiacu expresiu. Tieto expresné vektory sú obvykle replikovateľné v hostiteľských organizmoch buď ako epizómy, alebo ako integrálna súčasť chromozomálnej DNA hostiteľa. Všeobecne expresné vektory obsahujú selekčné markery, napr. tetracyklínový alebo neomycínový, umožňujúce detekciu buniek transformovaných požadovanou DNA sekvenciou.

E. coli je prokaryotický hostiteľ použiteľný na klonovanie polynukleotidov podľa predkladaného vynálezu. Medzi ďalšie použiteľné mikroorganizmy patria bacie, ako je *Bacillus subtilis*, a ďalšie *enterobacteriaceae*; ako je *Salmonella*, *Serratia* a rôzne *Pseudomonas species*. V týchto prokaryotických hostiteľoch je možné tiež pripraviť expresné vektory, ktoré budú obsahovať sekvencie riadiace expresiu kompatibilnú s hostiteľskou bunkou (napr. sekvenciu rozpoznávajúcu počiatok replikácie). Ďalej, môže byť použitý akýkoľvek počet dobre známych promótorov, ako je laktózový promótorový systém, tryptofánový (tip) promótorový systém, beta-laktamázový promótorový systém alebo promótorový systém z fágu lambda. Promótory

obvykle obsahujú sekvenciu riadiacu expresiu, voliteľne s operátorovou sekvenciou, a obsahujú sekvenciu väzbového miesta pre ribozóm a podobne, pre iniciáciu a dokončenie transkripcie a translácie.

Ďalšie mikróby, ako sú kvasinky, môžu byť tiež použité na expresiu. *Saccharomyces* sú výhodným hostiteľom a môžu byť použité s vhodnými vektormi obsahujúcimi sekvencie riadiace expresiu, ako sú promótor, vrátane 3-fosfoglycerát-kinázového alebo z iných glykolitických enzýmov, sekvenciu rozpoznávajúcu počiatok replikácie, termináčnej sekvencie a podobne.

Okrem mikroorganizmov môžu byť cicavčie tkanivové kultúry tiež použité na expresiu a produkciu polypeptidov podľa predkladaného vynálezu. Eukaryotické bunky sú naozaj výhodné, pretože v odbore existuje mnoho vhodných hostiteľských bunkových línií schopných secemovať intaktné imunoglobulíny a medzi tieto línie patria CHO bunkové línie, rôzne COS bunkové línie, bunkové línie ovariálnych buniek, HeLa bunky, výhodne myelómové bunkové línie, transformované B-lymfocyty, ľudské bunkové línie z embryonálnych obličiek lebo hybridóny. Expresné vektory pre tieto bunky môžu obsahovať sekvencie na riadenie expresie, ako je sekvencia rozpoznávajúca počiatok replikácie, promótor, zosilňovač transkripcie a nutné miesta na spracovanie, ako sú väzbové miesta pre ribozómy, miesta na zostrih RNA, polyadenylačné miesta, sekvencie na ukončenie transkripcie. Výhodnými sekvenciami na riadenie transkripcie sú promótor získaný z imunoglobulínových génov, SV40, adenovírusu, hovädzieho papilloma vírusu, cytomegalovírusu a podobne.

Vektory obsahujúce požadovanú nukleotidovú sekvenciu (napr. sekvencia kódujúca ťažký a ľahký reťazec a sekvencia riadiaca expresiu) môžu byť prenesené do hostiteľskej bunky dobre známymi spôsobmi, ktoré sú vybrané podľa typu hostiteľa. Napríklad pre prokaryotické bunky sa bežne používa transfekcia chloridom vápenatým, zatiaľ čo pre ostatné hostiteľské bunky sa bežne používa transfekcia s fosforečnanom vápenatým alebo elektroporácia.

Po expresii môžu byť celé protilátky, ich diméry, jednotlivé ľahké a ťažké reťazce, alebo iné formy imunoglobulínov podľa predkladaného vynálezu, prečistené s použitím štandardných postupov, vrátane zrážania síranom amónnym, iónovej výmeny, afinitnej, reverznej, hydrofóbnej chromatografie, gélovej elektroforézy a podobne. Výhodné sú významne prečistené imunoglobulíny majúce aspoň približne 90 až 95 % homogenitu, najvýhodnejšie sú na farmaceutické použitie imunoglobulíny majúce 98 až 99 % alebo vyššiu homogenitu. Po prečistení – čiastočnom alebo do požadovanej homogenity, môžu byť polypeptidy použité terapeuticky alebo profylakticky, ako je tu opísané.

Protilátky (vrátane imunologicky reaktívnych fragmentov) sú podávané jedincom s rizikom alebo existenciou príznakov súvisiacich s A β -peptidom, alebo s patológiou súvisiacou s A β peptidom, ako je klinická alebo predklinická Alzheimerova choroba, Downov syndróm alebo klinická alebo predklinická amyloidová angiopatia, s použitím štandardných techník podania, výhodne s použitím periférneho (t. j. nie podania do centrálného nervového systému) pomocou intravenózne, intraperitoneálnej, subkutánnej, pulmonálnej, transdermálnej, intramuskulárnej, intrazáľnej, bukalnej, sublinguálnej aplikácie alebo aplikácie v čapíku. Protilátky môžu byť tiež podané priamo do komorového systému, mozgovomiechového moku alebo mozgového parenchýmu, a techniky pre takéto podanie sú dobre známe v odbore, takže nie je nutné používať obtiažnejšie postupy. Protilátky podľa predkladaného vynálezu sú teda účinné, keď sú podané s použitím jednoduchších techník, ako je podanie do periférnej cirkulácie. Medzi výhody predkladaného vynálezu patrí schopnosť protilátky vykazovať priaznivé účinky i vtedy, keď nie je podaná priamo do centrálného nervového systému. Okrem toho bolo zistené, že množstvo protilátky, ktoré prekonáva hematoencefalickú bariéru, je <0,1 % plazmatickej koncentrácie a že protilátky podľa predkladaného vynálezu majú schopnosť sekvestrovať A β v periférnej cirkulácii, rovnako ako meniť klírens CNS a plazmatického solubilného A β .

Farmaceutické prostriedky sú navrhnuté tak, aby boli vhodné pre vybraný spôsob podania, a farmaceuticky prijateľné prísady, ako sú disperzné činidlá, pufre, surfaktanty, konzervačné činidlá, solubilizačné činidlá, činidlá upravujúce izotonicitu, stabilizačné činidlá a podobne, sú použité podľa potreby. Remington's Farmaceutické Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, posledné vydanie, tu uvedené ako odkaz, poskytuje techniky na prípravu farmaceutických prostriedkov. Predovšetkým výhodné môže byť zmenenie rozpustnosti protilátky podľa predkladaného vynálezu tak, aby bola viac lipofilná, napríklad s použitím enkapsulácie v lipózomoch alebo blokováním polárnych skupín.

Výhodné je periférne systémové podanie intravenózne alebo intraperitoneálne, alebo podkožnou injekciou. Vhodné vehikula pre takéto injekcie sú známe. Ďalej môže byť podanie uskutočnené cez sliznice s použitím nazálneho aerosólu alebo čapíkov. Vhodné prípravky pre takéto podanie sú dobre známe a obvykle obsahujú surfaktanty, ktoré uľahčujú prienik membránou. Takéto surfaktanty sú často odvodené od steroidov alebo kationových lipidov, ako je N-[1-(2,3-dioleoyl)propyl]-N,N,N-trimetylammóniumchlorid (DOTMA) alebo rôzne zlúčeniny, ako je cholesterol hemisukcinát, fosfatidylglyceroly a podobne.

Koncentrácia ľudskej izolovanej protilátky v prostriedkoch je od približne 0,1 % do 15 alebo 20 % hmotnostných a je určená podľa objemu kvapalín, viskozity a podobne, v súlade s vybraným spôsobom podania. Tak môžu byť typické farmaceutické prostriedky pre injekcie pripravené tak, aby obsahovali 1 ml sterilnej pufrovanej vody a 1 – 100 mg humanizovanej protilátky podľa predkladaného vynálezu. Prípravok by mal byť sterilne prefiltrovaný po výrobe alebo by mal byť iným spôsobom upravený tak, aby bol mikrobiologicky

prijateľný. Typický prostriedok pre intravenóznú infúziu by mal mať objem asi 250 ml, napríklad s použitím sterilného Ringerovho roztoku, a koncentrácia protilátky by mala byť 1 – 100 mg na ml.

Terapeutické činidlá podľa predkladaného vynálezu môžu byť zmrazené alebo lyofilizované na uskladnenie a rekonštitúciu vo vhodnom sterilnom nosiči pred použitím. Lyofilizácia a rekonštitúcia môžu viesť k rôznemu stupňu straty aktivity protilátky (napr. pri bežných imunoglobulínoch majú IgM protilátky tendenciu k väčšej strate aktivity ako IgG protilátky). Dávky by mali byť upravené na účely kompenzácie tejto straty. pH prostriedku by malo byť také, aby bola dosiahnutá rovnováha medzi stabilitou protilátky (chemickou a fyzikálnou) a komfortom pacienta pri aplikácii. Všeobecne je tolerované pH medzi 4 a 8.

Hoci sa uvedené spôsoby zdajú byť najvhodnejšie a najvýhodnejšie na podanie proteínov, ako sú humanizované protilátky, môžu byť použité aj iné spôsoby podania, ako je transdermálne podanie a orálne podanie, pokiaľ je pripravený vhodný prostriedok.

Ďalej, môže byť výhodné použiť prostriedky s riadeným uvoľňovaním s použitím biodegradovateľných povlakov a matric alebo osmotických minipump, alebo systémov na báze dextránových korálikov, alginátu alebo kolagénu.

Prostriedky na podanie protilátok podľa predkladaného vynálezu sú dobre známe v odbore a môžu byť vybrané z rôznych možností.

Typické dávky môžu byť optimalizované s použitím štandardných klinických techník a dávky závisia od spôsobu podania a stavu pacienta.

Nasledujúce príklady ilustrujú, ale nijak neobmedzujú predkladaný vynález.

Príklady uvedené ďalej využívajú, okrem iného, myšiu monoklonálnu protilátku označenú „266“, ktorá bola pôvodne pripravená imunizáciou peptidom zloženým zo zvyškov 13-28 ľudského A β peptidu. Bolo potvrdené, že táto protilátka je imunoreaktívna s týmto peptidom, ale skôr bolo uvedené, že nereaguje s peptidom obsahujúcim len zvyšky 17-28 ľudského A β peptidu alebo akýkoľvek iný epitop v A β peptide. Prostriedok obsahujúci túto protilátku je opísaný v U.S. patente 5,766,846, ktorý je tu uvedený ako odkaz. Pretože príklady opisujú pokusy uskutočnené na myšiach, je použitie myšej monoklonálnej protilátky uspokojuv. Ale, v liečbe ľudí s použitím spôsobov podľa predkladaného vynálezu sú výhodné humanizované formy protilátky s imunošpecifitou zodpovedajúcou protilátke 266.

Príklad 1

Sekvestrácia pridaného A β peptidu v ľudských tekutinách

Vzorky ľudského mozgovomiechového moku (CSF) (50 μ l) a ľudskej plazmy (50 μ l) sa inkubovali počas 1 hodiny pri teplote miestnosti nasledujúcim spôsobom:

1. samostatne;
2. spolu s 5 ng A β 40 peptidu alebo
3. 5 ng A β 40 peptidu plus 1 mg monoklonálnej protilátky 266 (opísané napríklad v U.S. patente 5,766,846, ktorý je tu uvedený ako odkaz).

Vzorky sa potom spracovali elektroforézou na 4 – 25 % nedenaturujúcim gradientovom géli, t. j. nedenaturujúcou gradientovou elektroforézou (NDGGE) a preniesli sa do nitrocelulózy. Škvry sa potom farbili Ponceau S alebo, pre Westernovú hybridizáciu, sondaovali biotínom-značenou monoklonálnou protilátkou (3D6), ktorá je namierená oproti prvým piatim aminokyselinám A β peptidu, vyvíjali sa s použitím streptavidínu-chrovej peroxidázy a detegovali sa pomocou zosilnenej chemiluminiscencie (ECL). Hydratované priemery materiálov obsiahnutých v prúžkoch na blotoch sa vyhodnocovali s použitím Pharmacia markerov molekulej hmotnosti. Pokiaľ sa A β peptid viazal na iné molekuly, prechádzal gélom podľa veľkosti vzniknutého komplexu.

Westernová hybridizácia CSF s alebo bez 5 ng A β peptidu neukazovala žiadny dôkaz A β peptidu pri detekcii pomocou protilátky 3D6. Podobné výsledky boli získané pre ľudskú plazmu. Toto platilo aj napriek skutočnosti, že A β peptid mohol byť detegovaný SDS-PAGE po Westernovej hybridizácii s použitím rovnakej techniky a na rovnakých vzorkách CSF. Pravdepodobne bránila detekcii A β peptidu interakcia medzi týmto peptidom a inými faktormi v testovaných kvapalinách. Ale, keď bola MAb 266 pridaná k inkubácii, tak boli prúžky charakteristické pre sekvestrujúci A β peptid v komplexe s protilátkou prítomnou tak v plazme, ako v CSF. Hlavný prúžok má hydratovaný priemer približne 11 nm, čo zodpovedá monoméru protilátky, menší prúžok mal 13 nm, čo zodpovedá diméru protilátky.

Príklad 2

Špecifická sekvestrujúca látka

Použili sa vzorky obsahujúce 50 μ l ľudského CSF alebo 10 μ l APP^{V717F} CSF. APP^{V717F} sú transgénne myši reprezentujúce myšiu model Alzheimerovej choroby, v ktorých je exprimovaný transgén pre ľudský amyloidový prekurzorový proteín s familiárnou mutáciou pre Alzheimerovu chorobu, čo vedie k produkcii ľudského A β peptidu v centrálnom nervovom systéme.

Vzorky sa inkubovali s alebo bez rôznych MAb (1 ug) počas 1 hodiny pri teplote miestnosti, a potom sa spracovali elektroforézou na 4 – 25 % NDGGE a preniesli sa na nitrocelulózu spôsobom opísaným v príklade 1. Protilátky boli nasledujúce:

- 5 MAb 266 (viaže sa na pozície 13-28);
- MAb 4G8 (viaže sa na pozície 17-24);
- QCBpan (králičia polyklonálna protilátka pre pozície 1-40);
- myší IgG (nešpecifický);
- MAb 3D6 (viaže sa na pozície 1-5);
- MAb 21F12 (viaže sa na pozície 33-42);
- 10 MAb 6E10 (viaže sa na pozície 1-17) a
- QCB40, 42 (králičia polyklonálna protilátka pre A β 40 a A β 42).

Detekcia komplexu A β peptid-protilátka sa uskutočnila spôsobom opísaným v príklade 1 s použitím biotínom značenej 3D6 (k N-koncu A β peptidu), a potom streptavidínu-HRP a ECL. Podobná detekcia bola uskutočnená v ľudskom CSF inkubovanom s MAb 266, v niektorých prípadoch zamenenou za QCB40,42, ktorá sa viaže na karboxylový koniec A β peptidu, pre 3D6.

Výsledky ukazujú, že z testovaných protilátok len MAb 4G8 a MAb 266 umožňujú detekciu A β peptidu. Výsledky ukazujú, že pre ľudský CSF len MAb 266 a MAb 4G8 môžu sekvestrovať v detegovateľných množstvách komplex protilátka-A β (opäť bez protilátky nebol A β detegovaný). MAb 266 bola tiež schopná produkovať podobné výsledky ako výsledky získané s ľudským CSF s CSF z APP^{V717F} transgénnych myší. A β peptid mohol byť sekvestrován v ľudskom CSF s použitím MAb 266 bez ohľadu na to, či bola na vyvíjanie vo westernovom prenose použitá 3D6 alebo QCB40.42 protilátka.

Príklad 3

Demonštrácia komplexu A β peptid-266 dvojrozmernou elektroforézou

25 Vzorka obsahujúca 50 ng A β peptidu sa inkubuje s 2 ug MAb 266 pri 37 °C počas 3 hodín. Rovnaká inkubácia MAb 266 samotnej sa použije ako kontrola.

Vzorky sa potom spracujú 2-dimenzionálnou elektroforézou.

V prvom rozmere sa inkubované vzorky spracujú NDGGE, ako je opísané v príklade 1. Polyakrylamidové gély sa potom nastrihajú na jednotlivé dráhy kolmé na smer toku v prvom rozmere a v druhom rozmere sa uskutoční gélová separácia za denaturačných/redukčných podmienok pomocou SDS-PAGE (Tricin-ureové gély). Prítomnosť prúžkov sa deteguje buď Ponceau-S farbením (akýkoľvek proteín), alebo špecifickým farbením s použitím 6E10 MAb (Senetek, Inc.) a biotinylovanej anti-myšej A13 v detekčnom systéme na báze HRP.

35 Ponceau-S farbenie nitrocelulóзовých membrán po prenose umožňuje vizualizáciu ťažkého a ľahkého MAb 266 samostatne. Pomocou tohto farbenia bolo potvrdené, že A β peptid bol v komplexe s MAb 266 ako prúžok veľkosti 4 kD, čo zodpovedá veľkosti kompletnej MAb 266 v prvom rozmere NDGGE.

Príklad 4

Demonštrácia non-ekvivalencie väzby a sekvestrácie

40 Predpokladá sa, že A β peptid cirkulujúci v plazme a CSF je obsiahnutý v komplexe s proteínmi, vrátane apolipoproteínu E. Tento príklad demonštruje to, že protilátky k apoE, hoci sa viažu na komplex, nesekvestrujú apoE od zvyšku komplexu.

ApoE komplexy (500 ng) sa inkubovali s MAb alebo polyklonálnymi protilátkami k apoE (2 ug) pri teplote 37 °C počas 1 hodiny. Inkubované vzorky sa potom spracovali NDGGE s použitím techník opísaných v príklade 1. Po NDGGE sa uskutočnil westernový prenos s afinitne prečistenou kozou anti-apoE protilátkou s detekciou pomocou ECL. Keď nebola prítomná žiadna protilátka, tak mohol byť apoE detegovaný pri 8-13 nm, čo je v súlade s prítomnosťou lipoproteínových častíc. Prítomnosť monoklonálnej alebo polyklonálnej protilátky k apoE viedla k posunu apoE k väčším molekulám, tzv. „super posunu“. Toto ukazuje, že protilátky k apoE nesekvestrujú, t. j. neodstraňujú apoE z lipoproteínových častíc, ale skôr sa viažu na apoE na lipoproteínoch za vzniku väčších molekúl.

Príklad 5

Sekvestrácia A β nie je narušená anti-apoE protilátkami

55 Vzorka 100 ul ľudského CSF sa inkubuje buď s MAb 266 samotnou, alebo s polyklonálnu anti-apoE, alebo s oboma protilátkami počas 60 minút pri teplote 37 °C. Vzorky sa potom analyzujú NDGGE, ako je opísané v príklade 1 a detekcia prúžkov sa uskutoční, ako je opísané v príklade 1.

Výsledky ukazujú, že keď je MAb 266 pridaná k vzorke, tak je pozorovateľný približne 11 nm prúžok charakteristický pre sekvestrováný komplex 266-A β peptid. Tak je to bez ohľadu na to, či je alebo nie je prítomná anti-apoE. Tento prúžok, demonštrujúci sekvestrováný A β , sa tiež objaví vtedy, keď sa 50 ng A β pep-

tidu pridá k inkubačnej zmesi za prítomnosti MAb 266. Tak alterácia molekulovej hmotnosti apoE prítomnosťou anti-apoE protilátky neinterferuje so sekvestráciou A β peptidu MAb 266.

Príklad 6

5 Sekvestrácia A β peptidu *in vivo*

A. Transgénne APP^{V717F} myši, tiež označované ako PDAPP myši, nadmerne exprimujú mutantnú formu ľudského APP proteínu. Tieto myši produkujú ľudský A β v CNS a majú zvýšené koncentrácie ľudského A β peptidu cirkulujúceho v CSF a plazme. 8-mesačným myšiam bol intravenóznou injekciou podaný salinický roztok alebo 100 ug MAb 266. Krv bola týmto myšiam odobratá 10 minút po injekcii, a potom znova za 20

10 hodín po prvej injekcii. Vzorky obsahujúce 20 ul plazmy od každého zvieraťa boli analyzované NDGGE a Westernovou hybridizáciou s protilátkou 3D6, ako je opísané v príklade 1. Zvieratá, ktorým bol podaný salinický roztok, nemali charakteristický 11 nm prúžok zodpovedajúci sekvestrovanému A β peptidu po 10 minútach, ani po 20 hodinách. Ale, dve zvieratá, ktorým bola injekčne podaná MAb 266, mali tento prúžok po 20 hodinách.

15 B. V tomto pokuse sa použili 2 mesačne staré APP^{V717F} myši. V deň 0 sa myšiam podala buď žiadna MAb 266, alebo 1 mg MAb 266, alebo 100 ug tejto protilátky. Vzorky plazmy sa odobrali dva dni pred podaním protilátky a v dňoch 1, 3, 5 a 7. Vzorky plazmy sa spracovali NDGGE, a potom Westernovou hybridizáciou a detekciou s 3D6, ako je opísané v príklade 1. Vo všetkých časoch po podaní MAb 266 bol komplex 266/A13 detegovaný bez ohľadu na to, že vzorka plazmy bola spracovaná proteínom G, ktorý sa viaže na

20 imunoglobulín, čím účinne odstraňuje MAb 266. V testovanom období boli detegované stabilné koncentrácie komplexu s výnimkou ľahkého poklesu v deň 7 pri zvieratách, ktorým bolo aplikovaných 100 ug MAb 266; všeobecne boli koncentrácie pri zvieratách, ktorým bolo podaných 100 ug, nižšie ako pri zvieratách, ktorým bol podaný 1 mg tejto protilátky. C. Dvomi 2-mesačným APP^{V717F} myšiam sa intravenózne podal 1 mg MAb 266 a od každej myši sa odo-

25 brala 25 ug vzorka plazmy. Vzorka plazmy sa spracovala NDGGE, a potom Westernovým prenosom, ako je opísané s tou výnimkou, po väzbe biotinylovanej 3D6 sa uskutočnila detekcia streptavidínom^{125I} (Amersham) a expozícia na fosfo-detekčnom zariadení. Koncentrácia komplexu sa hodnotila v porovnaní so štandardnou krivkou získanou s použitím známych množstiev A β 40 v komplexe so saturačnou koncentráciou MAb 266 a podobnej detekcie. Množstvo A β peptidu naviazaného na MAb 266 bolo približne 100 ng/ml, čo

30 predstavuje približne 1,000-násobné zvýšenie vzhľadom na endogénny A β peptid pri týchto myšiach, ktoré je približne 100 ul/ml. Toto je tiež podobné koncentrácii A β peptidu v mozgu APP^{V717F} myši pred depozíciou A β (50-100 ng/g); ľudský APP a ľudský A β v APP^{V717F} myšiach sú produkované takmer výlučne v mozgu. Tak sa zdá, že prítomnosť MAb 266 v plazme spôsobí vychytenie A β peptidu uľahčujúce vyľučovanie A β peptidu z CNS do plazmy. Toto zvyšuje vyľučovanie v dôsledku zvýšeného presunu A β z CNS do plazmy a

35 tiež prevenciu prenikania A β z plazmy do mozgu. Správna veľkosť sekvestrovaného A β peptidu sa potvrdí spracovaním 20 ul vzoriek plazmy získaných od APPV717F myši za 24 hodín pre injekciu 1 mg MAb 266 na TRIS-tricinových SDS-PAGE géloch, a potom

40 Westernovou hybridizáciou s použitím anti-A β protilátky 6E10 pred alebo po spracovaní proteínom G s použitím korálkov s naviazaným proteínom G. Prúžok, ktorý bol depletovaný proteínom G, bol detegovaný pri 4-8 kD, čo zodpovedá prítomnosti monomérov a snád' i dimérov A β peptidu.

D. 2-mesačným APP^{V717F} myšiam sa aplikoval intraperitoneálne buď PBS (n=7), alebo 500 mg biotinylovanej MAb 266 – t. j. m266B (n=9). Pred injekciou a 24 hodín po injekcii sa plazma analyzovala na celkový A β peptid s použitím modifikácie ELISA metódy podľa Johnson-Wood, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:1550-1555; a Bales, K. R., et al., Nature Genet (1997) 17:263-264. Celkový A β naviazaný na m266B sa stanovil s použitím 96-jamkových Optiplotnas (Packard, Inc.), potiahnutých m3D6. Nariedené

45 vzorky plazmy a štandardy (rôzne koncentrácie A β 40 a m266B) sa inkubovali cez noc v potiahnutých platniach a množstvo A β /m266B komplexu sa určilo s použitím ^{125I}-streptavidínu. Ďalej, po 24-hodinách sa vzorky plazmy najprv spracovali proteínom G pre kvantifikáciu A β peptidu nenaviazaného na MAb 266, a celkový A β a A β ₄₂ sa určil ELISA v CSF. Pri myšiach s aplikovaným PBS boli plazmatické koncentrácie A β peptidu 140 ul/ml pred i po injekcii. Plazmatické koncentrácie boli podobné pri myšiach s aplikovanou MAb 266 pred injekciou, ale koncentrácie A β peptidu nenaviazaného na MAb 266 boli nedetegovateľné 24 hodín po injekcii.

55 Tiež sa merali koncentrácie v CSF. CSF reprezentuje extracelulárny kompartment v CNS a koncentrácie molekúl v CSF v určitom rozsahu odrážajú koncentrácie substancií v extracelulárnom priestore mozgu. CSF sa izoloval z kompartmentu cisterna magna. Myši sa anestezovali pentobarbitolom, a potom sa odstránila svalovina na báze lebkovej až prvého stavca. CSF sa získal opatrnou punkciou arachnoidnej membrány prekrývajúcej cisternu s použitím mikroihly a disekčného mikroskopu a CSF sa odobral do polypropylénovej mikropipety. Po 24 hodinách po injekcii sa detegovalo zvýšenie celkového A β peptidu v CSF myši s injekciou MAb 266, ktoré bolo približne 2-násobné v A β ₄₂ v porovnaní s myšami, ktorým bol aplikovaný PBS. Toto

bolo potvrdené s použitím denaturačnej gélovej elektroforézy a potom westemovou hybridizáciou s A β ₄₂-špecifickou protilátkou 21F12.

V ďalšom pokuse sa 3-mesačným APP^{V717F} injikoval intravenózne buď PBS, alebo MAb 266 a nasledujúcim spôsobom sa hodnotili koncentrácie A β ₄₀ a A β ₄₂ v CSF:

Na meranie A β ₄₀ sa použila monoklonálna protilátka m2G3 špecifická pre A β ₄₀. Opísaný ELISA test (Johnson-Wood, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:1550-1555) sa modifikoval na RIA nahradením streptavidín-HRP činidla ¹²⁵I-streptavidínom. Fpro vzorky plazmy a CSF sa test uskutočnil za nedena-
 5 turačných podmienok s chýbaním guanidínu v pufoch. Na hodnotenie A β peptidu rozpustného a neroz-
 pustného v karbonáte v mozgovom homogenáte sa vzorky homogenizovali s 100 mM karbonátom, 40 mM
 10 NaCl, pH 11,5 (40C), odstredili sa pri 10,000 x g v priebehu 15 mm a A β sa hodnotil v supernatantovej (so-
 lubilnej) a peletovej (insolubilnej) frakcii, ako bolo opísané skôr (Johnson-Wood, K., et al., Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA (1997) 94:1550-1555) a ako bolo uvedené. Meranie komplexu A β /MAb 266 v plazme sa uskutoč-
 nilo modifikovanou RIA. Myšiam sa podala biotinylovaná MAb 266 (MAb 26GB) a plazma sa izolovala
 15 v rôznych časoch. Celkový A β naviazaný na MAb 266 sa meral s použitím 96-jamkových Optiplotnas (Pac-
 kard, Inc.) potiahnutých m3D6. Riedené vzorky plazmy a štandardy (rôzne koncentrácie A β ₄₀ a MAb 26GB)
 sa inkubovali cez noc v potiahnutých platniach a množstvo komplexu celkový A β /MAb 266B sa určilo s po-
 užitím ¹²⁵I-streptavidínu.

3 hodiny po intravenóznei injekcii MAb 266 bolo detegované 2-násobné zvýšenie koncentrácie A β ₄₀
 v CSF a nesignifikantné zvýšenie A β ₄₂. Ale, za 24 a 72 hodín bolo pozorované 3-násobné zvýšenie A β ₄₀ a
 20 A β ₄₂ v CSF. Podobné výsledky boli získané s použitím analýzy na denaturačnom géli nasledované westemo-
 vou hybridizáciou celkového CSF. Vylučovanie A β prostredníctvom mozgovej intersticiálnej kvapaliny, kto-
 ré sa odráža v koncentráciách CSF, je pravdepodobne zodpovedné za pozorované zvýšenie A β v CSF.

Významné je to, že zmena v koncentráciách A β peptidu v CSF nemôže byť spôsobená prienikom MAb
 266 do CSF, pretože koncentrácie zmerané 24 hodín po injekcii, ktoré sú nižšie ako 0,1 % plazmatických
 25 koncentrácií MAb 266, sú nedostatočné na to, aby spôsobili tieto zmeny. Tieto výsledky naznačujú, že A β
 peptid je presúvaný z mozgového parenchýmu do CSF prítomnosťou protilátky v krvnom riečišti.

Formy A β peptidu, ktoré sú rozpustné v PBS alebo uhličitanovom pufrí, boli merané v homogenátoch
 mozgovej kôry od rovnakých myší, ktorým bola aplikovaná MAb 266 a pri ktorých bol CSF analyzovaný
 30 opísaným spôsobom. Bolo pozorované podobné zvýšenie týchto solubilných foriem v homogenátoch moz-
 govej kôry.

Priklad 7

MAb 266 účinkuje *in vitro* ako vychytávač A β peptidu

Dialyzačná komôrka sa pripravila ako *in vitro* systém na testovanie schopnosti MAb 266 vychytávať A β
 35 peptid. 1 ml ľudskej CSF sa umiestnil do hornej komôrky polypropylénovej skúmavky separovanej dialyzač-
 nou membránou s medzou priepustnosti 10-100 kD od spodnej komôrky obsahujúcej 75 μ m PBS s alebo bez
 1 μ l MAb 266.

Zdalo sa, že rovnováha bola dosiahnutá po 3 hodinách, ako sa určilo spracovaním materiálu zo spodnej
 komôrky na kyslých močovínových géloch, a potom Westernovým prenosom na prítomnosť A β peptidu
 40 s 6E10 v rôznych časoch. Vzorky sa denaturovali v kyseline mravčej na konečnú koncentráciu 80 %
 (obj./obj.) a redukovali sa B-merkaptotanolom (1 %). Vzorky sa spracovali elektroforézou (anóda-katóda)
 v 0,9 M pracovnom pufrí s kyselinou octovou na 4 % až 35 % polyakrylamidovom gradientovom géli obsa-
 hujúcim 6 M močoviny, 5 % (obj./obj.) ľadovou kyselinou octovou a 2,5 % TEMED. Kyslé pH gélu sa neut-
 45 ralizovalo pred prenosom na nitrocelulózu. Potom sa štandardné techniky westemového prenosu použili na
 identifikáciu A β . Detegované pružky zodpovedali 4 kD.

Množstvo A β odstráneného z hornej komôrky sa takto určilo ELISA analýzou hornej a dolnej komôrky
 (n=4) po 3 hodinách. Výsledky pre rôzne medze molekulovej hmotnosti za prítomnosti a neprítomnosti MAb
 266 sú uvedené na obr. 1. Ako je uvedené, zatiaľ čo len minimálne množstvo A β peptidu prekonáva mem-
 50 bránu, keď je v dolnej komôrke prítomný PBS, 50 % A β peptidu sa sekvestruje v dolnej komôrke, keď táto
 komôrka obsahuje MAb 266 a limit molekulovej hmotnosti je 25 kDa; väčšie množstvo prichádza vtedy, keď
 sa limit molekulovej hmotnosti zvýši na 100 kDa, keď takmer 100 % A β peptidu prechádza cez membránu.

Tiež sa pozorovalo, že protilátky oproti N-koncu A β 3D6 a 10D5 sú schopné spôsobiť v tomto systéme
 prenos A β cez membránu, hoci neboli schopné sekvestrovat' A β peptid v testoch opísaných v príklade 1. Tie-
 55 to výsledky ukazujú, že protilátky k A β peptidu majú za týchto podmienok dostatočnú afinitu na sekvestro-
 vanie peptidu vo fyziologických roztokoch od iných väzbových proteínov, ale že MAb, ako je 266, ktoré sú
 imunoreaktívne s epitopom v pozícii 13-28, sú významne viac účinné a viažu sa s vyššou afinitou.

V podobných testoch mal apoE4 secerovaný astrocytmi prečistený spôsobom opísaným v DeMattos, R.
 B., et al., J. Biol. Chem. (1998) 273:4206-4212; Sun, Y., et al., J. Neurosci. (1998) 18:3261-3272, malý, ale
 60 štatisticky významný efekt na zvýšenie množstva A β peptidu v dolnej komôrke. Žiadny efekt nebol pozoro-
 vaný vtedy, keď bol polyklonálny IgG alebo BSA zameraný za MAb 266.

Príklad 8

Tok A β peptidu z CNS do plazmy

A. 1 ug A β 40 sa rozpustil v 5 ul krysiho CSF na uchovanie v rozpustenom stave, a potom sa injikoval do subarchnoidálneho priestoru cisterna magna normálnych Swiss-Webster myši, ktorým boli predtým podané i.v. injekcie buď PBS (n=3), alebo 200 ug biotinylované MAb 266 (n=3). V rôznych časoch po liečbe sa celkový A β v plazme myši určil A β ELISA s použitím 3D6 ako povlakovej protilátky a štandardov A β v zmesi s nadbytkom biotinylovanej 266. Do každej vzorky plazmy sa po odbere od každého zvierat'a pridal nadbytok biotinylovanej 266 pre P43 detekciu v ELISA. Pri myšiach liečených PBS boli minimálne detegovateľné množstvá peptidu v koncentráciách 0,15 ng/ml detegované ako pikové hodnoty po 30 – 60 minútach, a potom boli hodnoty prakticky nulové. Pri myšiach, ktorým bola podaná MAb 266, dosiahli plazmatické koncentrácie P43 peptidu hodnôt 330-násobne vyšších ako pri myšiach s injekciou PBS po 60 minútach (približne 50 ng/ml) a dosahovali hodnoty približne 90 ng/ml po 180 minútach.

B. Tento postup sa opakoval s použitím buď 200 ug (n=3), alebo 600 ug (n=3) injikovaných i.v. 2-mesačným APP^{V717F} myšiam. MAb 266 sa injikovala i.v. 3-mesačným APP^{V717F} myšiam s použitím uvedených dávok. Pred a v rôznych intervaloch po i.v. injekcii sa plazmatická koncentrácia A β naviazaného na MAb 266 určila RIA. Podrobné výsledky od jednej myši sú uvedené na obr. 2.

Bolo zistené, že koncentrácia A β p naviazaného na monoklonálnu protilátku MAb 266 sa zvýšila zo základných hodnôt 150 ul/ml na hodnoty 100 ng/ml za 4 dni. Analýzou skorých častí krivky sa určilo, že čistá rýchlosť vstupu A β _{tot} do plazmy u APP^{V717F} Ig myši je 42 ul/ml/minútu za prítomnosti saturačných koncentrácií protilátky.

Účinky MAb 266 na plazmatické koncentrácie A β u prirodzených a APP^{V717F} Tg myši, rovnako ako účinky protilátky na koncentrácie A β v CSF ukazujú, že prítomnosť MAb 266 v cirkulácii vedie k zmene rovnováhy v transporte A β medzi CNS a plazmou.

Príklad 9

Účinok MAb 266 na A β v mozgu

4-mesačné APP^{V717F/+} myši sa liečili každé 2 týždne počas 5 mesiacov IP injekciami salinického roztoku, MAb 266 (500 ug) alebo injekciami kontrolného myšieho IgG (100 ug, Pharmigen). Myši sa utrtili vo veku 9 mesiacov a určilo sa ukladanie A β v mozgovej kôre. % plochy pokrytej A β -imunoreaktivitou, ako bola určená králičou pan-A β protilátkou (QCB, Inc.), sa kvantifikovalo v kôre mozgovej ihneď po farbení dorzálného hipokampu, ako je opísané v Holtzman, D. M., et al., Ann. Neurol. (2000) 97:2892-2897. Výsledky sú uvedené na obr. 3A. V tomto veku sa pri približne polovici myši z každej skupiny ešte nezačali vyvíjať depozitá A β . Ale, % myši s >50 % ukladáním A β v mozgovej kôre bolo signifikantne nižšie (P=0,02, Chi-kvadrátový test) v skupine liečenej 266. Hoci sa u APPV717P myši môžu vyvíjať väčšie depozitá A β v 9 mesiacoch, existuje značná variabilita s približne 50 % bez depozitov a približne 50 % s výraznými depozitmi. Pri zvieratách liečených PBS a IgG malo 6/14 a 5/13 myši viac ako 50 % mozgovej kôry zafarbené A β farbením, zatiaľ čo len jedna zo 14 myši liečených MAb 266 mala túto úroveň farbenia. Takmer 50 % zvierat vo všetkých skupinách nemalo ukladanie A β v 9 mesiacoch veku. Toto sa zdá byť spôsobené pôvodom myši v našej kohorte, pretože hoci boli všetky testované myši overené ako APPV717+/, boli vysoké hladiny deponovania A β pozorované len u myši zo 4/8 párov (vrhy s vysokou patológiou). Myši z druhých 4 vrhov boli v podstate bez depozitov A β (vrhy s malou patológiou). S použitím vrhov ako kopremennej bol zjavný silný, štatisticky významný efekt m266 na redukcii deponovania A β (p=0,0082, obr. 3B).

Príklad 10

Periférne injikovaná MAb 266 sa neviaže na plaky u APPV717F Tg myši

Na stanovenie toho, či sa MAb 266 injikovaná i.p. v priebehu 5 mesiacov viaže na A β v mozgu sa použili rezy mozgom od 9-mesačnej APP^{V717F} Tg myši, ktoré obsahovali depozitá A β a ktoré boli liečené MAb 266, salinickým roztokom alebo kontrolným IgG. Spracovanie tkaniva a imunofarbenie sa uskutočnili opísaným spôsobom (Bales, K.R., et al., Nature Genet. (1997) 17:263-264). Tkanivá od všetkých skupín zvierat sa inkubovali s fluoresceínom-značeným anti-myším IgG (Vektor. Inc.), a potom sa hodnotili pod fluorescenčným mikroskopom. V žiadnej skupine nebolo pozorované špecifické farbenie A β depozitov. Naopak, pri aplikovaní MAb 266 na rezy pred inkubáciou rezov s anti-myším IgG boli depozitá A β jasne definované.

Príklad 11

Efekt podania protilátky 266 na kognitívne funkcie 24-mesačných transgénnych hemizygotných PDAPP myši

Použilo sa 16 hemizygotných transgénnych myši (APP^{V717F}). Myši boli v čase začiatku testu staré 24 mesiacov. Všetky injekcie boli intraperitoneálne (i.p.). Polovici myši sa podávali raz týždenne injekcie s fosfátom pufrovaného salinického roztoku (PBS, kontrola) a druhej polovici injekcie 500 ug myšej protilátky 266 rozpustenej v PBS. Injekcie sa uskutočňovali počas 7 týždňov (42 dní), celkovo 6 injekcií. 3 dni po poslednej

injekcií sa hodnotilo správanie zvierat s použitím testu kognitívnych funkcií, ako je opísaný v J.C. Dodart, et al., Behavioral Neuroscience, 113 (5) 982-990 (1999). Vypočítal sa index kognitívnych funkcií (TB x 100) / (TB-TA).

Výsledky sú uvedené ďalej v tabuľke 1.

5

Tabuľka 1

Index kognitívnych funkcií				
	N	Priemer	Štandardná odchýlka	Štandardná chyba
Kontrola (PBS)	8	7,22**	8,80	3,11
Protilátka 266	8	54,35	7,43	2,62

** p = 0,0010

10 Podávanie 500 ug protilátky 266 raz týždenne 24-mesačným hemizygotným transgénym myšiam bolo spojené so štatisticky významnou zmenou správania. Protilátkou liečené myši mali indexy kognitívnych funkcií podobné ako normálne kontrolné zvieratá [J.-C. Dodart, et al.]. Rozdiely v indexoch kognitívnych funkcií boli štatisticky významné pri p = 0,001. Vyšší index kognitívnych funkcií ukazuje, že liečba protilátkou, ktorá sa viaže na beta amyloidový peptid v regióne aminokyselín 13-28, revertuje poruchy správania, ktoré boli dokumentované v tomto myšom modeli Alzheimerovej choroby. Preto môže podanie protilátky, ktorá sa viaže na beta amyloidový peptid v regióne aminokyselín 13-28, liečiť ochorenie, ako je Alzheimerova choroba a Downov syndróm a tiež môže zastaviť zhoršovanie kognitívnych funkcií, ktoré je obvykle spojené s progresiou ochorenia.

20 Postihnutie amyloidom (% plochy zafarbené imunoreaktívnym materiálom po farbení anti-A β protilátkou 3D6 alebo 21F12) sa kvantifikovalo v mozgovej kôre po zafarbení hipokampu vrátane oblastí cinguly a parietálneho kortexu v mozgu 24-mesačných zvierat liečených myšou protilátkou 266 počas 7 týždňov, ako je opísané. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. Rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné.

25 Tabuľka 2: Množstvo amyloidových plakov u APPV171F +/- myši po liečbe myši 266 anti-A β protilátkou

Veľkosť plakov (%)					
Pri použití 3D6				Pri použití 21F12	
N		Priemer	Štandard. chyba	Priemer	Štandard. chyba
Kontrola (PBS)	7	44,3	5,93	0,77	0,14
Protilátka 266	8	38,0	2,96	0,93	0,11

30 Pre tieto veľmi staré zvieratá nevedie liečba myšou protilátkou 266 vo významne odlišnom množstve amyloidu v porovnaní so skupinou liečenou PBS, podľa merania buď pomocou 3D6, alebo s použitím 21F12. Ďalej, množstvo A β bolo významne vyššie a signifikantne zvýšené v porovnaní s množstvom amyloidu pri mladších zvieratách (pozri ďalej), ktoré neboli schopné rozpoznať nový objekt od známeho objektu v teste kognitívnych funkcií. Prekvapivo tieto výsledky demonštrujú, že anti-A β protilátky môžu revertovať kognitívne defekty bez nutnosti redukovať množstvo amyloidu samého osebe.

35 Po 7 týždňoch liečby sa index kognitívnych funkcií v skupine liečenej 226 štatisticky významne nelíšil od skupiny normálnych 24-mesačov starých myši. Toto ukazuje na kompletne vylepšenie kognitívneho deficitu pri týchto transgénnych myšiach.

Príklad 12

Efekt podania protilátky 266 na kognitívne funkcie u mladých transgénnych hemizygotných PDAPP myši

40 Použilo sa 54 homozygotných, transgénnych myši (APP^{V717F}). 23 myši bolo na začiatku testu vo veku približne 2 mesiace. Zostávajúce myši boli na začiatku testu vo veku približne 4 mesiace. Trvanie liečby bolo 5 mesiacov. Tak bol na konci testu vek myši približne sedem (7) mesiacov alebo približne deväť (9) mesiacov.

45 Všetky myši v kontrolnej „PBS“ skupine dostávali raz týždenne injekciu fosfátom pufrovaného salinického roztoku (PBS; 200 μ l). Všetky myši v „IgG“ kontrolných skupinách dostávali raz týždenne injekciu IgGkappal izotypu (100 ug/myš/týždeň). Všetky myši v „high dose“ skupinách dostávali raz týždenne injekciu 500 ug protilátky 266 rozpustenej v PBS („HD“). Všetky myši v „low dose“ skupinách dostávali raz týždenne injekciu 100 ug protilátky 266 rozpustenej v PBS („LD“). Tri dni po poslednej injekcii sa správanie myši hodnotilo s použitím testu kognitívnych funkcií, ako je opísané v príklade 10, a diskriminačný index sa vypočítal ako rozdiel medzi časom stráveným na novom objekte a časom stráveným na známom objekte. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 3. Dáta sú združené podľa veku myši na konci testu.

50

Tabuľka 3: Štatistika pre diskriminačný index

Diskriminačný index				
	N	Priemer	Štandardná odchýlka	Štandardná chyba
7 mesiacov				
PBS	7	2,12	4,22	1,59
IgG	8	0,81	3,64	1,29
HD	8	10,04*	6,52	2,30
9 mesiacov				
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

Dohromady tieto dáta podporujú záver, že podávanie protilátky 266, protilátky namierenej proti centrálnej doméne A β , zmierňuje deponovanie plakov u 7-9 mesačných APP^{V717F} myši, rovnako ako revertuje existujúce poruchy správania. Liečba pacientov protilátkou oproti A β peptidu bude inhibovať alebo brániť zhoršovaniu kognitívnych funkcií, ktoré je obvykle spojené s progresiou ochorenia, a bude obvykle revertovať takéto zhoršenie.

Diskriminačný index pre liečené zvieratá nebol štatisticky významne odlišný od indexu myši rovnakého veku. Preto – rovnako ako pri starších zvieratách (příklad 11) – liečba m266 úplne revertovala zhoršovanie kognitívnych funkcií pri týchto mladších transgénnych zvieratách.

Příklad 13

Syntéza humanizovanej protilátky 266

Bunky a protilátky. Myšia myelómová bunková línia Sp2/0 sa získala z ATCC (Manassas, VA) a kultivovala sa v DME médiu obsahujúcom 10 % PBS (kat. # SH32661.03, HyClone, Logan, UT) pri 37 °C v CO₂ inkubátore. Myšie 266 hybridómové bunky sa najprv kultivovali v RPMI-1640 médiu obsahujúcom 10 % FBS (HyClone), 10 mM HEPES, 2 mM glutamín, 0,1 mM neesenciálne aminokyseliny, 1 mM natriumpyruvát, 25 ug/ml gentamicínu, a potom sa expandovali v bezsérom médiu (Hybridoma SFM, kat # 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) obsahujúcom 2 % FBS s nízkym obsahom Ig (kat# 30151.03, HyClone) na objem 2,5 litra vo valcových skúmavkách. Myšia monoklonálna protilátka 266 (Mu266) sa prečistila zo supernatantu kultúry afinitnou chromatografiou s použitím proteín-G Sepharosovej kolóny. Biotinylovaná Mu266 sa pripravila s použitím EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotínu (kat # 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Klonovanie cDNA variabilného regiónu. Celková RNA sa extrahovala z približne 107 hybridómových buniek s použitím TRIzol činidla (Life Technologies) a poly(A)+ RNA sa izolovala pomocou PolyA Tract mRNA Isolation systému (Promega, Madison, WI) podľa návodu výrobcu. Dvojreťazcová cDNA sa syntetizovala s použitím SMART-RACE cDNA Amplification Kitu (Clontech, Palo Alto, CA) podľa návodu výrobcu. cDNA pre variabilné regióny pre ľahký a ťažký reťazec sa amplifikovali polymerázovou reťazcovou reakciou (PCR) s použitím 3'-primérov, ktoré sa viažu v príslušnom poradí na myšie kappa a gamma reťazce konštantných regiónov, a 5'univerzálneho priméru obsiahnutého v SMARTTM RACE cDNA Amplification Kite. Pre VL PCR mal 3'-primér sekvenciu:

5'-TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3' [SEQ ID NO: 13],

kde zvyšky 17-46 hybridizujú na myšiu Ck región. Pre VH PCR mali 3'-priméry degenerovanú sekvenciu:

A G T

5'-TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC-3'

T

[SEQ ID NO: 14],

sa zvyšky 17-50 hybridizujúcimi na myši gamma reťazec CH1. VL a VH cDNA sa subklonovali do pCR4Blunt-TOPO vektora (Invitrogen, Carlsbad, CA) na účely stanovenia sekvencie. DNA sekvencovanie sa uskutočnilo s použitím PCR cyklických sekvencovacích reakcií s fluorescentnými dideoxy-reťazcovými terminátormi (Applied Biosystems, Foster City, CA) podľa návodu výrobcu. Sekvencovacie reakcie sa analyzovali na Model 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Konštrukcia variabilných regiónov humanizovanej 266 (Hu266). Humanizácia V regiónov myšej protilátky sa uskutočnila spôsobom v Queen et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 1989]. Pracovný región ľudského V regiónu použitý ako akceptor pre Mu266 CDR sa vybral podľa homológie sekvencie. Počítačové programy AßMOD a ENCAD [Levitt, M., 1. Mol. Biol. 168:595-620 (1983)] sa použili na konštrukciu molekulového modelu variabilných regiónov. Aminokyseliny v humanizovanom V regióne, ktoré boli určené ako kontaktné s CDR, sa substituovali príslušnými zvyškami Mu266. Toto sa uskutočnilo vo zvyškoch 46, 47, 49 a 98 v ťažkom reťazci a so zvyškom 51 v ľahkom reťazci. Aminokyseliny v humanizovanom V regióne, ktoré boli vzácné v rovnakej podskupine V-regiónov, boli zmenené na konvenčné aminokyseliny na elimináciu potenciálnej imunogenicity. Toto sa uskutočnilo vo zvyškoch 42 a 44 v ľahkom reťazci.

Gény pre variabilné regióny ľahkého a ťažkého reťazca sa pripravili a amplifikovali s použitím 8 prekryvajúcich sa syntetických oligonukleotidov dĺžky od približne 65 do 80 báz [He, X.Y., et al., J. Immunol. 160: 029-1035 (1998)]. Oligonukleotidy sa tepelnou reakciou spárovali a predĺžili sa Klenovým fragmentom DNA polymerázy I, za získania 4 dvojreťazcových fragmentov. Získané fragmenty sa denaturovali, tepelnou reakciou sa spárovali a predĺžili sa Klenovým fragmentom za získania dvoch fragmentov. Tieto fragmenty sa denaturovali, tepelnou reakciou sa spárovali a znovu sa predĺžili za získania dvoch kompletných génov. Získaný produkt sa amplifikoval PCR s použitím Expand High Fidelity PCR Systému (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). PCR-amplifikované fragmenty sa prečistili na géli a klonovali sa do pCR4Blunt-TOPO vektora. Po potvrdení sekvencie sa VL a VH gény trávili MluI a XbaI, prečistili sa na géli a subklonovali sa v príslušnom poradí do vektorov pre expresiu ľahkého a ťažkého reťazca za získania pVκ-Hu266 a pVλ-Hu266 (pozri obr. 6 a 7, v príslušnom poradí). [Co. M. S., et al., J. Immunol. 148:1149-1154 (1992)]. Zrelá humanizovaná 266 protilátka exprimovaná z týchto plazmidov mala ľahký reťazec SEQ ID NO: 11 a ťažký reťazec SEQ ID NO: 12.

Stabilná transfekcia. Stabilná transfekcia do myšej myelómovej bunkovej línie Sp2/O sa uskutočnila elektroporáciou s použitím Gene Pulser prístroja (BioRad, Hercules, CA) pri 360 V a 25 uF, ako je opísané (Co et al., 1992). Pred transfekciou sa pVκ-Hu266 a pVλ-Hu266 plazmidové DNA linearizovali s použitím FspI. Približne 107 Sp2/O buniek sa transfekovalo 20 ug pVκ-Hu266 a 40 ug pVλ-Hu266. Transfekované bunky sa suspendovali v DME médiu obsahujúcom 10 % PBS a bunky sa umiestnili na niekoľko 96-jamkových platní. Po 48 hodinách sa pridalo selekčné médium (DME médium obsahujúce 10 % PBS, HT médiový doplnok, 0,3 mg/ml xantínu a 1 ug/ml kyseliny mykofenolovej). Približne 10 dní po začiatku selekcie sa supernatanty kultúry testovali na produkciu protilátok s použitím ELISA, ako je opísané ďalej. Klony s vysokou produkciou sa expandovali v DME médiu obsahujúcom 10 % PBS a ďalej sa analyzovali na expresiu protilátok. Selektované klony sa potom adaptovali na rast v Hybridoma SFM.

Meranie exprese protilátok ELISA. Jamky 96-jamkovej ELISA platne (Nunc-Immuno platňa, kat. # 43954, NalgeNunc, Naperville, IL) sa potiahli 100 ul 1 ug/ml kozím anti-ľudským IgG, špecifickým pre Fcγ fragment, polyklonálnou protilátkou (kat # 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) v 0,2 M pufrí tvoreným uhličitanom sodným-hydrogenuhličitanom sodným (pH 9,4) cez noc pri teplote 40 °C. Po premytí premyvacím pufrom (PBS obsahujúci 0,1 % Tween 20) sa jamky blokovali 400 pl Superblock Blocking Buffer (kat # 37535, Pierce) počas 30 minút, a potom sa premyli premyvacím pufrom. Vzorky obsahujúce Hu266 sa vhodne nariedili v ELISA pufrí (PBS obsahujúci 1 % BSA a 0,1 % Tween 20) a aplikovali sa na ELISA platne (100 pl na jamku). Ako štandard sa použila humanizovaná anti-CD33 IgG1 monoklonálna protilátka HuM195 (Co, et al., 1992). ELISA platňa sa inkubovala počas 2 hodín pri teplote miestnosti a jamky sa potom premyli premyvacím pufrom. Potom sa do každej jamky pridalo 100 ul 1/1000-riedenej HRP-konjugovanej kože anti-ľudskej kappa polyklonálnej protilátky (kat # 105 0-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) v ELISA pufrí. Po inkubácii počas 1 hodiny pri teplote miestnosti a premytí premyvacím pufrom sa do každej jamky pridalo 100 ul AβTS substrátu (kat # 507602 a 506502, Kirkegaard a Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Vyvíjanie farby sa ukončilo pridaním 100 ul 2 % kyseliny šťaveľovej na jamku. Absorbancia sa odčítala pri 415 nm s použitím OPTImax čítačky mikropatní (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Prečistenie Hu266. Jeden z transformantov s vysokou expresiou Hu266 označený ako Sp2/0 (klon 1D9) sa upravil na rast v Hybridoma SFM a expandoval sa na objem 2 litre v otočných bankách. Vyčerpaný supernatant kultúry sa získal potom, čo percento živých buniek dosiahlo 10 % alebo menej a vniesol sa do proteín-A Sepharosovej kolóny. Kolóna sa premyla PBS predtým, ako sa protilátka eluovala 0,1 M glycinom-HCl (pH 2,5), 0,1 M NaCl. Eluovaný proteín sa dialyzoval proti 3 výmenám 2 litrov PBS a prefiltraval sa cez 0,2 um filter pred uskladnením pri 40 °C. Koncentrácia protilátky sa určila meraním absorbancie pri 280 nM (1

mg/ml = 1,4 A280). SDS-PAGE v Tris-glycinovom pufri sa uskutočnila štandardným spôsobom na 4 – 20 % gradientovom géli (kat # EC6025, Novex, San Diego, CA.). Prečistená humanizovaná 266 protilátka sa redukovala a spracovala sa na SDS-PAGE géli. Celá protilátka vykazuje dva prúžky približnej molekulovej hmotnosti 25 kDa a 50 kDa. Tieto výsledky sú v súlade s molekulovými hmotnosťami pre ľahký reťazec a ťažký reťazec alebo fragment ťažkého reťazca vypočítanými podľa ich aminokyselinového zloženia.

Príklad 14

In vitro väzbové vlastnosti humanizovanej 266 protilátky

Väzbová účinnosť humanizovanej 266 protilátky, syntetizovanej a prečistenej opísaným spôsobom, sa porovnávala s myšou 266 protilátkou s použitím biotinylovanej myšej 266 protilátky v porovnávacej ELISA analýze. Jamky 96-jamkovej ELISA platne (Nunc-Immuno platňa, kat #439454, NalgeNunc) sa potiahli 100 ul 13-amyloidového peptidu (1-42) konjugovaného na BSA v 0,2 M pufri tvorenom uhličitanom sodným/hydrogenuhličitanom sodným (pH 9,4) (10 ug/ml) cez noc pri 40 °C. Konjugát A β 1-42-BSA sa pripravil rozpustením 7,5 mg A β 1-42-Cys43 (C-terminálny cystein na A β 1-42, AnaSpec) v 500 ul dimetylsulfidu, a potom okamžitým pridaním 1 500 ul destilovanej vody. 2 miligramy maleimidom-aktivovaného hovädzieho sérového albumínu (Pierce) sa rozpustili v 200 ul destilovanej vody. Tieto dva roztoky sa zmiešali a nechali sa stáť pri teplote miestnosti počas 2 hodín. Chromatografia na gélovej kolóne sa použila na separovanie nezreagovaného peptidu od konjugátu A β 1-42-Cys-BSA.

Na premytie jamiek fosfátom pufovaným salinickým roztokom (PBS) obsahujúcim 0,1 % Tween 20 (prenývací pufr) s použitím prenývacieho zariadenia pre ELISA platne sa jamky blokovali pridaním 300 ul SuperBlock činidla (Pierce) na jamku. Po 30 minútach blokovania sa jamky premyli prenývacím pufrom a odstránil sa nadbytok kvapaliny.

Zmes biotinylovanej Mu266 (konečná koncentrácia 0,3 ug/ml) a kompetičnej protilátky (Mu266 alebo Hu266; konečná koncentrácia od 750 ul/ml a sériové 3-násobné riedenia) v ELISA pufri sa pridala v trojitom prevedení v objeme 100 ul na jamku. Ako nekompetičná kontrola sa pridalo 100 ul 0,3 ug/ml biotinylovanej Mu266. Ako základná kontrola sa pridalo 100 ul ELISA pufru. ELISA platňa sa inkubovala pri teplote miestnosti počas 90 min. Po premytí jamiek prenývacím pufrom sa do každej jamky pridalo 100 ul 1 ul/ml HRP-konjugovaného streptavidínu (kat# 21124, Pierce). Platňa sa inkubovala pri teplote miestnosti počas 30 min. a premyla sa prenývacím pufrom. Na vývoj farby sa pridalo 100 ul/jamku ARTS Peroxidase Substrate (Kirkgaard & Perry Laboratories). Vývoj farby sa ukončil pridaním 2 % kyseliny šťaveľovej v dávke 100 ul/jamku. Absorbancia sa odčítala pri 415 nm. Absorbancie sa zanesli do grafu oproti logaritmu koncentrácie kompetitora, krivky sa upravili pre dáta (s použitím Prism) a určili sa IC₅₀ pre každú protilátku s použitím spôsobov dobre známych v odbore.

Priemerná IC₅₀ pre myšiu 266 bola 4,7 ug/ml (tri samostatné pokusy, štandardná odchýlka = 1,3 ul/ml) a pre humanizovanú 266 bola 7,5 ul/ml (tri samostatné pokusy, štandardná odchýlka = 1,1 ul/ml). Bol uskutočnený druhý súbor pokusov, v podstate tak, ako je opísané, a priemerná IC₅₀ pre myšiu 266 bola 3,87 ul/ml (SD = 0,12 ul/ml) a pre ľudskú 266 bola IC₅₀ 4,0 ul/ml (SD = 0,5 ul/ml). Podľa týchto výsledkov možno povedať, že humanizovaná 266 má väzbové vlastnosti, ktoré sú veľmi podobné vlastnostiam myšej protilátky 266. Preto sa predpokladá, že humanizovaná 266 má veľmi podobné *in vitro* a *in vivo* aktivity v porovnaní s myšou 266 a ďalej sa predpokladá, že bude mať u človeka rovnaké účinky ako myšia 266 pri myšiach.

Príklad 15

In vitro väzbové vlastnosti myších protilátok 266 a 4G8

Afinita protilátky (KD = Kd/Ka) sa určila s použitím BIAcore biosenzora 2000 a dáta sa analyzovali BIAevaluation (v.3.1) softvérom. Záchytná protilátka (králičia anti-myšia) sa naviazala prostredníctvom voľných aminoskupín na karboxylové skupiny na prietokovej komôrke 2 biosenzorového čipu (CM5) s použitím N-etyl-N-dimetylamínopropyl-karbodiimidu a N-hydroxysukcínimidu (EDC/NHS). Nešpecifický králičí IgG sa naviazal na prietokovú komôrkou 1 ako základná kontrola. Monoklonálne protilátky boli zachytené s dosiahnutím 300 rezonančných jednotiek (RU). Amyloid-beta 1-40 alebo 1-42 (Bioscience International Inc.) sa potom nechal pretekať okolo čipu v klesajúcich koncentráciách (1000 až 0,1-násobok KD). Na regeneráciu čipu sa naviazaná anti-A β protilátka eluovala z čipu s použitím výplachu glycinom-HCl (pH 2). Kontrolná injekcia neobsahujúca beta-amyloid slúžila ako kontrola na odčítanie základných hodnôt. Senzorgramy ukazujúce asociačné a disociačné fázy sa analyzovali na stanovenie Kd a Ka. S použitím tohto spôsobu bola afinita myšej protilátky 266 pre A β 1-40 a A β 1-42 stanovená na 4 pM. Afinita 4G8 pre A β 1-40 bola 23 nM a pre A β 1-42 bola 24 nM. I cez 6 000-násobný rozdiel v afinitách pre A β tak 266, ako 4G8, ktorá sa viaže na epitopy medzi aminokyselinami 13 a 28 A β , účinne sekvestrujú A β z ľudského CSF. Preto je lokalizácia epitopu najdôležitejšia – dôležitejšia ako väzbová afinita – na stanovenie schopnosti protilátky sekvestrovat' A β , a tým poskytovať výhody predkladaného vynálezu.

Príklad 16

Epitopové mapovanie myšej protilátky 266 s použitím Biacore metódy a solubilných peptidov

5 Biacore je automatizovaný biosenzorový systém na meranie molekulových interakcií (Karlsson R., et al., J. Immunol. Methods 145: 229-240 (1991)). Výhody Biacore v porovnaní s inými väzbovými testami spočívajú v tom, že väzba antigénu môže byť meraná bez značenia alebo imobilizácie antigénu (t. j. antigén je v prirodzenejšej konformácii). Biacore metóda bola použitá na hodnotenie väzby rôznych fragmentov beta-amyloidového peptidu na myšiu protilátku 266, v podstate tak, ako je to opísané v príklade 12, s tou výnimkou, že všetky riedenia boli uskutočnené s HEPES pufrovaným salinickým roztokom obsahujúcim Tween 20 a injikovali sa rôzne fragmenty A β (BioSource International), a injikovala sa jediná koncentrácia každého fragmentu (440 nM).

10 Fragmenty beta-amyloidu 1-28, 12-28, 17-28 a 6-25 sa viazali na myšiu protilátku 266, zatiaľ čo A β fragmenty 1-20, 10-20 a 22-35 sa neviazali na protilátku. Fragmenty 1-20, 10-20 a 22-35 sa viazali na iné mA β so známou epitopovou špecifitou pre tieto regióny A β . Podľa tejto metódy sa zdá, že väzbový epitop myšej protilátky 266 je medzi aminokyselinami 17 a 25 A β . Pretože sa väzba realizuje obvykle aspoň s 3 zvyškami v epitope, možno odvodiť, že epitop je obsiahnutý vo zvyškoch 19-23.

Príklad 17

In vitro väzbové vlastnosti humanizovanej protilátky 266

20 Afinita ($KD=Kd/Ka$) humanizovanej protilátky 266, syntetizovanej a prečistenej opísaným spôsobom, sa určila v podstate spôsobom opísaným v príklade 15. S použitím tohto spôsobu sa určila afinita humanizovanej 266 pre A β 1-42 ako 4 pM.

ZOZNAM SEKVENCÍ

<110> Holtzman, David M.

DeMattos, Ronald

Bales, Kelly R.

Paul, Steven M.

Tsurushita, Naoya

Vasquez, Maximiliano

<120> Humanizovaná protilátka, jej fragment a ich použitie, polynukleová kyselina, expresný vektor, bunka a farmaceutický prostriedok

<130> 2522/18478BR

<150> PCT/US01/06191

<151> 2001-02-26

<150> 60/184,601

<151> 2000-02-24

<150> 60/254,465

<151> 2000-12-08

<150> 60/254,498

<151> 2000-12-08

<160> 18

<170> Verzia PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Arg	Tyr	Ser	Met	Ser
1				5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 5

Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<21U> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 6

Gly	Asp	Tyr
1		

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa v polohe 2 je Val alebo Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa v polohe 7 je Ser alebo Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa v polohe 14 je Thr alebo Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa v polohe 15 je Leu alebo Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30) .. (30)

<223> Xaa v polohe 30 je Ile alebo Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50) .. (50)

<223> Xaa v polohe 50 je Arg, Gln alebo Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (88) .. (88);

<223> Xaa v polohe 88 je Val alebo Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (105) .. (105)

<223> Xaa v polohe 105 je Gln alebo Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (108) .. (108)

<223> Xaa v polohe 108 je Lys alebo Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (109) .. (109)

<223> Xaa v polohe 109 je Val alebo Leu

<400> 7

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

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa v polohe 1 je Glu alebo Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa v polohe 7 je Ser alebo Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46) .. (46)

<223> Xaa v polohe 46 je Glu, Val, Asp alebo Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (63) .. (63)

<223> Xaa v polohe 63 je Thr alebo Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (75) .. (75)

<223> Xaa v polohe 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76) .. (76)

<223> Xaa v polohe 76 je Lys alebo Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89) .. (89)

<223> Xaa v polohe 89 je Glu alebo Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107) .. (107)

<223> Xaa v polohe 107 je Leu alebo Thr

<400> 8

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

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Umělá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 9

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

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

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

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

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

Arg

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Umělá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 10

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 11

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 12

<211> 442

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 12

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetický oligonukleotid

<400> 13

tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatcacgt tggtagc

46

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetický oligonukleotid

<400> 14

tatagagctc aagcttccag tggatagach gatggggatg tygttttggc

50

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 15

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

1

5

10

15

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetické humanizované protilátky

<400> 16

Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 17

<211> 1950

<212> DNA

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetický polynukleotid

<400> 17

acgcgtccac	catgaagttg	cctgttaggc	tgttggtgct	gatgttcctgg	attcctgctt	60
ccaggtgtga	tgttgtgatg	accagagacc	cactctccct	gcctgtcacc	cttgacaaac	120
cagccctccat	ctcttgcaga	tctagtcaga	gccttatata	tagtgaatga	aacgcctatt	180

tacatttggt	cttgcagaag	ccaggccagt	cctcaagggt	cctgctctac	aaagtttcca	240
accgatttcc	tgggggtccc	gacaggttca	gtggcagtgg	atctgggaca	gatttcacac	300
tcaagatcag	cagagtggag	gccgaggatg	tgggagttta	ttactgttct	caaagtacac	360
argttccgtg	gaagtccgtt	caaggcacca	aggtggaaat	caaacgtgag	tagaatttaa	420
tctagaaatt	ctaaactctg	agggggctgg	atgacgtggc	cattctttgc	ctaaagcatt	480
gagtttactg	caaggtcaga	aaagcatgca	aagccctcag	aatggctgca	aagagctcca	540
acaaaacaat	ttagaacttt	attaaggaat	agggggaagc	taggaagaaa	ctcaaaacat	600
caagatttta	aatagcttcc	ttggtctcct	tgcataaatt	atctgggata	agcatgctgt	660
ttctgtctg	tccctaacat	gccctgtgat	tatccgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	720
cttgttact	caaacaccat	cctgttttgt	tcttccctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	780
tgtcttcata	tcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	840
cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tggaagggtg	ataacgccct	900
ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	960
cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaaag	agactacgag	aaacaacaaag	tctacggctg	1020
cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	1080
ttagagggag	aagtgcctcc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccctt	cccatccttt	1140
ggcctctgac	cttttttcca	caggggacct	acctctattg	cggctctcca	gtcatctttt	1200
caactcacc	ccctccctcc	ccttggcttt	aattatgcta	atgttgaggg	agaatgaata	1260

astaaagtga atctttgcac ctgtgggtttc tctctttcct catttaataa taattatctg 1320
 ttgtttttacc aactactcaa tttctcttat aagggaactaa atatgtagtc atcctaaggc 1380
 gataaacat ttataaaat catcttctat tctatrttac cctatcates tctgcaagac 1440
 agtctctcct caaacccaca agctttctgt cctcacagtc cctggggcca tggtaggaga 1500
 gacttgcttc ctgtttttcc cctctcagc aagccctcat agtctttttt aagggtgaca 1560
 ggtcttacag tcataatcc tttgattcaa ttccctgaga atcaaccasa gcaaattttt 1620
 caaaagaaga aacctgctat aaagagaatc attcaattga acatgatata aaataacaac 1680
 acaataaag caattaaata aacaaacaat agggaaatgt ttaagttcat catggtactt 1740
 agacttaatg gaatgtcatg ccttatttac atttttaaac aggtactgag ggaactcctgt 1800
 ctgccaaggg ccgtaattgag tacttttcac aacctaatth aatccacact atactgtgac 1860
 attaaaaaca ttcaataaaa tcttgcaag gttctataaa gctgagagac aaatatattc 1920
 tataactcag caatcccaat tctaggtacc 1980

<210> 18

<211> 3221

<212> DNA

<213> Umelá

<220>

<223> Syntetický polynukleotid

<400> 18

acgggtccac catgaatttc gggctcagct tgattttcct tctccttggt ttaaaagggtg 60

tccctgtgtga agtgacagctg gtggagttctg gggcacgttt agtgacagcct ggaggggtccc	120
tgagacrtctc ctgtgcagcc tctggattca cttttagtag gtattccatg tcttgggttc	180
gdcaggctcc aggcaagggc ctggaattgg tggcacaat taatagtggt ggtaatagca	240
cctacratcc agacactgta aaggggcgat tcccatctc cagagaccaat gccagaaca	300
ccctgtacct gcaaatgaac tccctgaggg ccgaagacac ggcctgtat tactgtgcaa	360
gaggagacta ctggggccaa ggcacctgg tgacagtctc ctgaggtag tctcacaac	420
ctctagagct tcttggggca gccaggcct gaacttggct ttggggcagg gagggggcta	480
aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtag cacccaatgc ccatgagccc agacactgga	540
cgctgaacct cggggacagt taagaaccca ggggctctg cgcctgggc ccagctctgt	600
cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct ctgtcagcct ccaccaaggg cccatcggtc	660
tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggcctt gggctgctg	720
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	780
ggcgtgcaca ccttcccgcc tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg	840
gtgacctgac cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag	900
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt ggtgagaggc cagcacaggg agggagggtg	960
tctgtggaa gccaggctca gcgtctctgc ctggacgcat ccgggtatg cagccccagt	1020
ccagggcagc aaggcaggcc ccgtctgctt ctccaccgg aggcctctgc ccgccccact	1080
catgctcagg gagaggggtt tctggctttt tccccaggt ctgggcaggc acaggctagg	1140

tgcctcctaac	ccaggccctg	cacacaaaagg	ggcaggtgct	gggctcagac	ctgccaagag	1200
ccatctccgg	gaggaccctg	cccttgacct	aagcccaccc	caaaggccaa	actctccact	1260
ccctcagctc	ggacaccttc	tctctcctcc	gattccagta	actcccaatc	tctctctctg	1320
agcccaaatc	ttgtgacaaa	actcacacat	gcccaacctg	cccaggtaag	ccaggcccagg	1380
cctcgccctc	cagctcaagg	cgggacaggt	gccttagagt	agcctgcctc	cagggacagg	1440
ccccagccgg	gtgctgacac	gtccacctcc	atctcttctc	cagcacctga	actcctgggg	1500
ggaccgtcag	tcttccctct	ccccccaaaa	cccaaggaca	ccctcctgat	ctcccggaac	1560
cctgaggtca	catgcgtggg	ggtggacgtg	agccaagaa	acctgaggt	caagttcaac	1620
tggctacgtg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccgcggga	ggagcagta	1680
aacagcacgt	acctgtgtgt	cagcgtctct	acctctctgc	accaggaaag	gtggaatggc	1740
aaggagtaca	agtgcagggt	ctccaacaaa	gcctctccag	cccccatcga	gaaaaaccatc	1800
tccaaagcca	aagggtgggac	ccgtgggggtg	cagggggccac	atggacagag	gccggctcgg	1860
cccacctctc	gccttgagag	tgacctgtgt	accaacctct	gtccctacag	ggcagccccg	1920
agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	ctgaccaaga	accaggctcag	1980
cctgacctgc	ctgggtcaaa	gtttctatcc	cagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	2040
tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	ctggactccg	acggctctct	2100
cttctctctc	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	cagcagggga	acgtcttctc	2160
atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	2220

tccgggtaaa	tgagtgcgac	ggccggcaag	cccccgctcc	ccgggctctc	gcggtcgnac	2280
gaggatgctt	ggcactgacc	ccctgtacat	actccccggg	ggcccagcah	ggaaataaag	2340
cacccagcgc	tgccctgggc	ccctgogaga	ctgtgatggt	tctttccacg	ggtcaggccg	2400
agtcctgaggc	ctgagtggca	tgagggagggc	agagcgggtc	ccactgtccc	cacactggcc	2460
caggctgtgc	aggtgtgcct	gggccgccta	gggtggggct	cagccagggg	ctgccctcgg	2520
cagggtagggg	gatttgccag	cgtagggcctc	cctccagcag	cacctgccct	gggctggggc	2580
acgggaagcc	ctaggagccc	cgggggacag	acacacagcc	cctgcctctg	taggagactg	2640
tctgtttctg	tgagcgccct	gtcctccgac	ctccatgccc	actcgggggc	atgcctagtc	2700
catgtgcgta	gggacaggcc	ctccctcacc	catctacccc	cacggcacta	acccctggct	2760
gccctgcccc	gcctgcacc	cgcctggggg	cacaaccgac	tccggggaca	tgactctctg	2820
ggccctgtgg	agggactggg	gcagatgccc	acacacacac	tcagcccaga	ccggttcac	2880
aaaccccga	ctgagggttg	ccggccacac	ggccaccaca	cacacacgtg	cacgcctcac	2940
acacggagcc	tcacccgggc	gaactgcaca	gcacccagac	cagagcaagg	tctcgnaca	3000
cgtgaacact	cctcggacac	aggcccccac	gagccccacg	cggcacctca	aggccacga	3060
gcctctcggc	agcttctcca	catgctgacc	tgctcagaca	aacccagccc	tcctctcaca	3120
agggtgcccc	tgacgcggcc	acacacacac	aggggatcac	acaccacgtc	acgtccctgg	3180
ccctggcccc	cttcccaqtg	ccgcctttcc	ctgcaggatc	c		3221

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostriedok obsahujúci humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na použitie na prevenciu alebo liečbu predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

- CDR1 l'ahkého ref'azca:

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

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID NO: 15)

- CDR2 l'ahkého ret'azca:

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

- CDR3 l'ahkého ret'azca:

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

a sekvenciu kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ľahkého reťazca, a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

- CDR1 ťažkého reťazca:

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

- CDR2 těžkého řetězce:

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) alebo

Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
(SEQ ID NO: 16) a

- CDR3 těžkého řetězce:

1
Gly Asp Tyr
(SEO ID NO

a sekvenciu kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ťažkého reťazca.

2. Farmaceutický prostriedok obsahujúci humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na použitie na prevenciu, liečbu alebo reverziu kognitívneho deficitu pri subjekte, ktorému bola diagnostikovaná predklinická alebo klinická Alzheimerova choroba, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 l'ahkého ret'azca:

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

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 l'ahkého ref'azca:

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

- CDR3 ľahkého reťazca:

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

a sekvenciu kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ľahkého reťazca, a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

1 5
Arg Tyr Ser Met Ser

(SEQ ID NO: 4)

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

– CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr

(SEQ ID NO: 6),

a sekvenciu kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulinového ťažkého reťazca.

3. Farmaceutický prostriedok na použitie podľa nárokov 1 alebo 2, kde protilátka obsahuje CDR1 ľahkého reťazca:

1 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEQ ID NO: 1) a

CDR2 ťažkého reťazca:

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. Farmaceutický prostriedok na použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde humanizovaná protilátka obsahuje variabilný región ľahkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

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),

kde

Xaa v pozícii 2 je Val alebo Ile;

Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Thr;

Xaa v pozícii 14 je Thr alebo Ser;

Xaa v pozícii 15 je Leu alebo Pro;

Xaa v pozícii 30 je Ile alebo Val;

Xaa v pozícii 50 je Arg, Gln alebo Lys;

Xaa v pozícii 88 je Val alebo Leu;

Xaa v pozícii 105 je Gln alebo Gly;

Xaa v pozícii 108 je Lys alebo Arg a

Xaa v pozícii 109 je Val alebo Leu;

a variabilný región ťažkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

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),

kde

Xaa v pozícii 1 je Glu alebo Gln;

Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Leu;

Xaa v pozícii 46 je Glu, Val, Asp alebo Ser;

Xaa v pozícii 63 je Thr alebo Ser;

Xaa v pozícii 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr;

Xaa v pozícii 76 je Lys alebo Arg;

Xaa v pozícii 86 je Glu alebo Asp a

Xaa v pozícii 107 je Leu alebo Thr.

5. Farmaceutický prostriedok na použitie podľa nároku 4, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 9 a variabilného regiónu ťažkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 10.

6. Farmaceutický prostriedok na použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 11 a variabilného regiónu ťažkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 12.

7. Použitie farmaceutického prostriedku obsahujúceho humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu A β , na výrobu liečiva na prevenciu alebo liečenie predklinickej alebo klinickej Alzheimerovej choroby, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľahkého reťazca:

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

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 ľahkého reťazca:

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

– CDR3 ľahkého reťazca:

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

a sekvenciu kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ľahkého reťazca, a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

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

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

5 – CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO: 6),

a sekvenciu kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ťažkého reťazca.

10 8. Použitie farmaceutického prostriedku obsahujúceho humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na epitop obsiahnutý v pozíciách 13 až 28 peptidu Aβ, na výrobu liečiva na prevenciu, liečenie alebo reverziu kognitívneho deficitu pri subjekte, ktorému bola diagnostikovaná predklinická alebo klinická Alzheimerova choroba, kde uvedená protilátka obsahuje:

a) ľahký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ľahkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ľahkého reťazca:

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

20 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 ľahkého reťazca:

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

– CDR3 ľahkého reťazca:

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

a sekvenciu kostrovej oblasti ľahkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ľahkého reťazca, a

b) ťažký reťazec obsahujúci tri regióny určujúce komplementaritu (CDR) ťažkého reťazca majúce ďalej uvedené aminokyselinové sekvencie:

– CDR1 ťažkého reťazca:

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

– CDR2 ťažkého reťazca:

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) alebo

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) a

– CDR3 ťažkého reťazca:

1
Gly Asp Tyr
(SEQ ID NO: 6),

a sekvenciu kostrovej oblasti ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového ťažkého reťazca.

50 9. Použitie farmaceutického prostriedku podľa nárokov 7 alebo 8, kde protilátka obsahuje CDR1 ľahký reťazec:

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

CDR2 ťažkého reťazca:

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. Použitie farmaceutického prostriedku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 7 až 9, kde humanizovaná protilátka obsahuje variabilný región ľahkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:

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
 5 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
 10 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

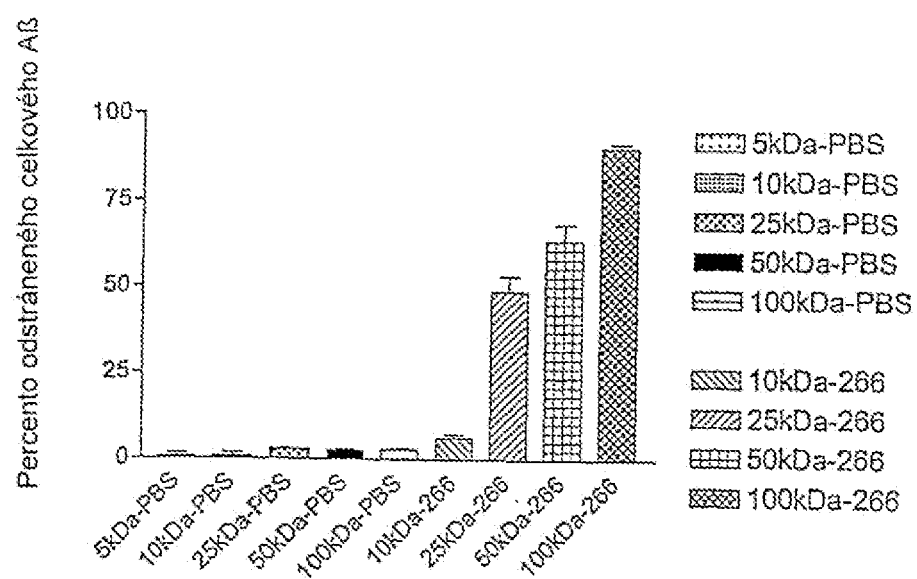
15 Arg
 (SEQ ID NO: 7),
 kde
 Xaa v pozícii 2 je Val alebo Ile;
 Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Thr;
 20 Xaa v pozícii 14 je Thr alebo Ser;
 Xaa v pozícii 15 je Leu alebo Pro;
 Xaa v pozícii 30 je Ile alebo Val;
 Xaa v pozícii 50 je Arg, Gln alebo Lys;
 Xaa v pozícii 88 je Val alebo Leu;
 25 Xaa v pozícii 105 je Gln alebo Gly;
 Xaa v pozícii 108 je Lys alebo Arg a
 Xaa v pozícii 109 je Val alebo Leu;

a variabilný región ťažkého reťazca obsahujúci ďalej uvedenú sekvenciu:
 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
 35 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
 40 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

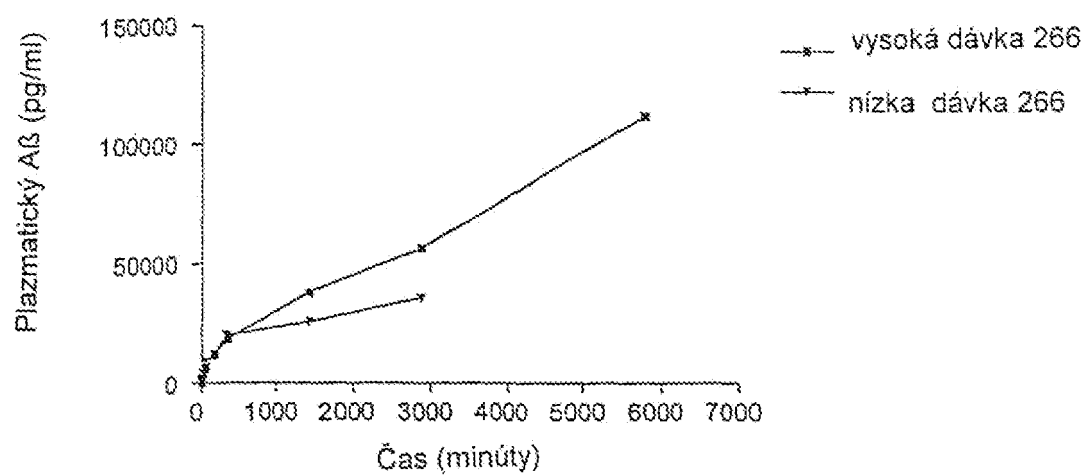
(SEQ ID NO: 8),
 kde
 45 Xaa v pozícii 1 je Glu alebo Gln;
 Xaa v pozícii 7 je Ser alebo Leu;
 Xaa v pozícii 46 je Glu, Val, Asp alebo Ser;
 Xaa v pozícii 63 je Thr alebo Ser;
 Xaa v pozícii 75 je Ala, Ser, Val alebo Thr;
 50 Xaa v pozícii 76 je Lys alebo Arg;
 Xaa v pozícii 89 je Glu alebo Asp a
 Xaa v pozícii 107 je Leu alebo Thr.

11. Použitie farmaceutického prostriedku podľa nároku 10, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 9 a variabilného regiónu ťažkého reťazca uvedenú v SEQ ID NO: 10.

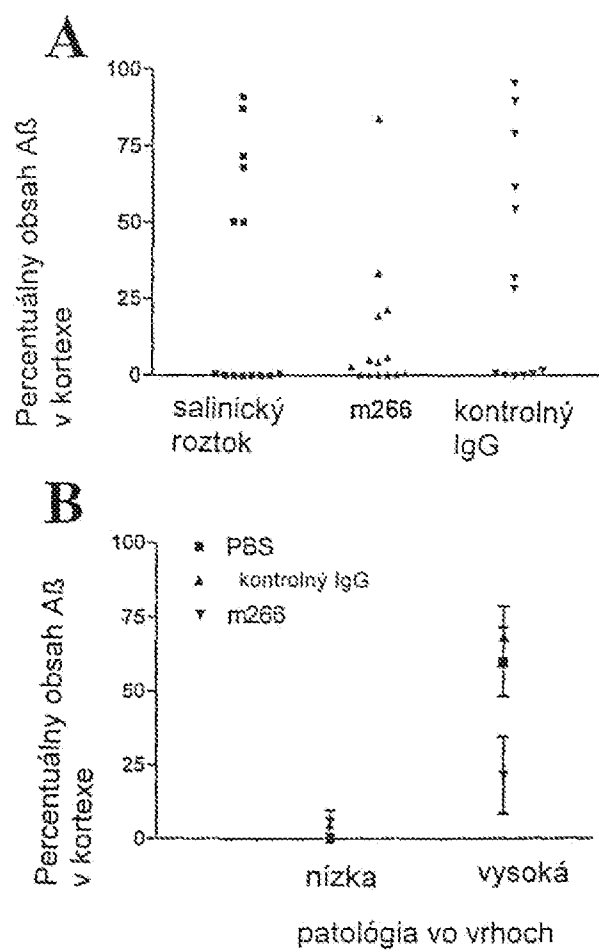
12. Použitie farmaceutického prostriedku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 7 až 11, kde protilátka má sekvenciu variabilného regiónu ľahkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 11 a variabilného regiónu ťažkého reťazca obsahujúcu SEQ ID NO: 12.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

619 ACGCGTCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCATGTTCTGGATTCCCTGCTCCAGGTGTGATGTTGTGATG
 M K L P V R L L V L M F W I P A S R C E V V M
 699 ACCCAGAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTTCGACAACCAGCCTCCATCTCCTTCAGATCTAGTCAGAGCCTTATATA
 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 TAGTGTGGAAACGCCATTATTACATTGGTTCTTTCAGAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA
 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 ACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCASTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
 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 GCCGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGACGTTCCGTCAAGGCACCAAGGTGGAAT
 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 CAAACGTGAGTAGAATTTAATCTAGAAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGATGACCTGCCATTCTTTGCCCTAAAGCAAT
 K R
 1099 GAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAAGAGCTCCAAACAAAACAATTTAGAACTTT
 1179 ATTAAGGAATAGGGGCAAGCTAGCAAGAAACTCAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCCTATAATT
 1259 ATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACACACCCAGGGCAGAA
 1339 CTTTGTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCTCAGGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
 T V A A P S V F I P P P S
 1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGSAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 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 TCGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGSACAGCACCTACAG
 K V D N A L Q S G N S Q S S V T E Q D S K D S T Y S L
 1579 CCTCAGCAGCACCTGAGCCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCCAAGTCACCATCAGGGCC
 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 TGACCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGC
 S S P V T K S F N R G E C *
 1739 CTGACCCCTCCCATCTCTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTT
 1819 CACCTCACCCCTCTCTCTCTGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAGTGAATCTTTGCAC
 1899 CTGTGTTTTCTCTCTTCTCTCATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGACTAA
 1979 ATATGTAGTCTATCTTAAGCGCATAACCAATTATATAAAATCATCCTTCATTCTATTTTACCCCTATCATCTCTGCAAGAC
 2059 AGTCTCTCCCTCAAACCCACAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCTCGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTCTGTTTTCC
 2139 CCTCTCAGCAAGCCCTCATAGTCCCTTTTAAAGGGTACAGGTCCTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATTCCTGAGA
 2219 ATCAACCAAAGCAATTTTCAAAGAAGAAACCTGCTATAAAGASAATCATTCATTGCAACATGATATAAAATAACAAC
 2299 ACAATAAAAGCAATTARATAAAACAACAATAGGGGAAATGTTTAAAGTTCATCATGCTACTTASACTTAAATGGAAATGTCATG
 2379 CCTTATTTACATTTTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTTCCACACCTAATTT
 2459 AATCCACACTATACTGTGAGATTAAAAACATTCATTTAAATGTTGCAAGGTTCTATAAGCTGAGAGACAAATATATTC
 2539 TATAACTCAGCAATCCCACCTTCTAGGATCC

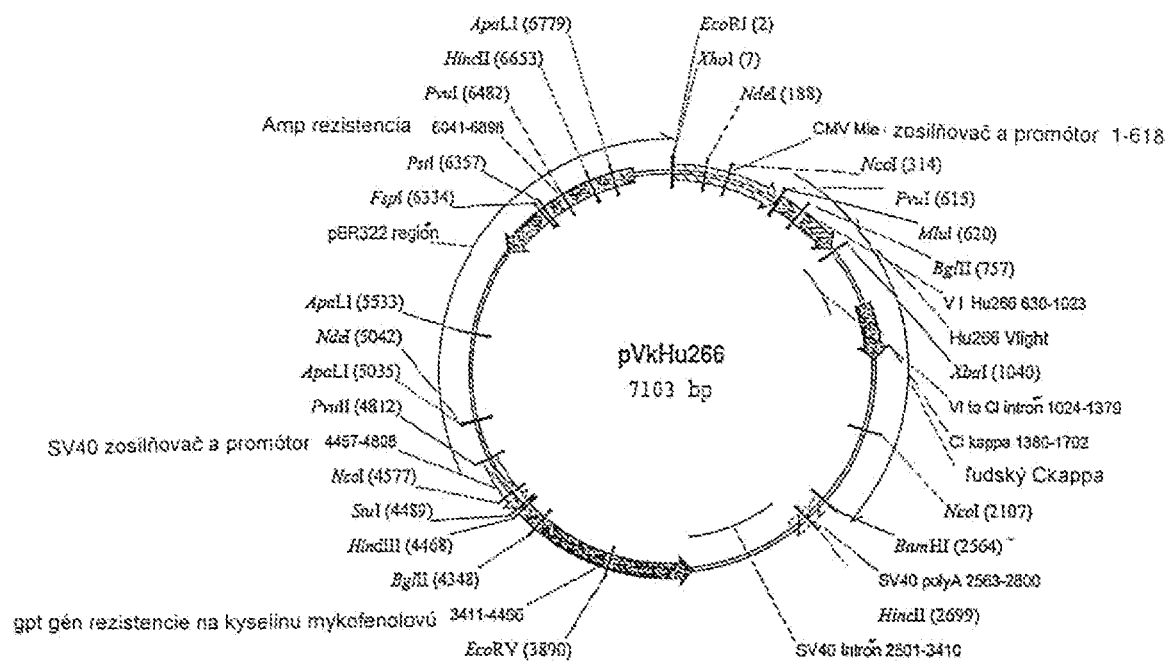
Obr. 4

619 ACAGCTCCACCATGAATTTGGGCTCAGCTGATTTTCTCTGCTCTGTTTTTAAAGGTGTCTCTGTGTGAAGTGCACCTG
 M N P G L S L I P L V L V L K G V L C E V Q L
 699 GTGGAGTCTGGGGAGGTTTAGTGACAGCTTGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTGAGCTCTGTGATTCTCTTTTAGTAG
 V E S G G G L V Q P G S S L R L S C A A S G F T F S R
 779 GTATCTCATGTCTTGGGTTGGCAGGCTCCAGGCAAGGCTTGGATTTGGTGGCACAATTAATAGTGTGGTAAATAGCA
 Y S M S N V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S
 859 CCTACTATCCAGACACGTAAAGGGCCGATTCACCACTCTCCAGAGACAAATGGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAC
 T X 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 TCCCTGAGGGCCGAGACACAGGCTGTATTTACTGTGCAAGGAGAGACTACTGGGGCCAGGCAACCCCTGTGTGACATGTCTC
 S L K 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 CTCAGGTGAGTCTTCACAACTCTAGAGCTTTCTGGGCGAGGCCAGGCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGAGGGGCTA
 S
 1099 AGGTGAGGCGAGTGGCGCCAGGCCAGGTGCACACCAATGCCCCATGAGCCGAGACACTGGAGCGCTGAACTCTGCGACAGT
 1179 TAAACAACCCAGGGGCTCTGTGCGCCCTGGGCGCAGCTCTGTGCCACACCGCGGTCAATGGCAACCACTCTCTTGCAGGCT
 A
 1259 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGACAGGGGCGCTGGCTG
 S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L S C L
 1339 GTCAAGCACTACTTCCCGAAGCGGTGACGCTGTCTGTGAATCTCAGGCGCCCTGACAGCGGCTGTGCACCTTCCCGGC
 V E D Y F F E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A
 1419 TGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCTCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACA
 V L Q S S G L Y S L S V V T V P S S S L G T Q T Y
 1499 TCTGCAACGTGAATCAGAAAGCCAGCAACCAAGGTGGGCAAGAAAGTTGGTGAGAGGGCCAGCAGGGGAGGGGCTG
 I C N V N X K P S N T K V D K K V
 1579 TCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGGCTCTCTGCTGCAACCATCCCGGCTATGCAAGCCCAAGTCCAGGCGACAGGCGAGGCT
 1659 CCGTCTGCTCTCTCAACCGGAGGCTCTGCGCCGCCCACTCATGCTCAGGAGAGGCTCTTCTGCTTTTTCCCGAGGCT
 1739 CTGGGCGAGGACAGGCTAGGTCGCCCTAACCCAGGCTCTGCAACAAAGGGGAGGCTGCTGGGCTCAGACCTTCCAGAG
 1819 CCATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGACCTAAGCCCAACCCCAAGGCCAACTCTGCACTTCCCTCAGCTCGGACACTT
 1899 TCTCTCTCCAGATTTCAGTAATCTCCCAATCTTCTCTCTGCAAGGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCAGACATGCTCCACCG
 E P K S C D K T H T C P P
 1979 TSCCCAGGTAAGGCGAGGCCAGGCTCGGCCCTCCAGCTCAAGGCGGACAGGCTGCTAGAGTACCTTGCATCCAGGACCA
 C P
 2059 GGCCCCAGGCGGGTGTGACACCTTCCACCTCATCTCTTCTCTCAGCACCTGAACTCTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTCTC
 A P E L L S G G P S V F L
 2139 TTCCCCCAAAACCCAGAGACCCCTCATGATCTCCCGAGCCCTGAGGTTCACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGCA
 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 K E
 2219 AGACCTTACAGTCAAGTTCAACTGTGATGAGGAGCGGCTGAGGCTGATATGCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGT
 D P E V K F N W Y V D G V S V H N A K T K P R E E Q
 2299 ACAACAGCAGCTACCTGTGTGTCAGGCTCTCAGCGTCTGCAACAGGACTGSGTGAATGGCAAGSAGTCAAGTCAAG
 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 GTCTGCAACAAAGCCCTCCAGGCTCCCATGAGAAACCATCTTCCAAAGCCAAAGGTGGACCCGCTGGGTGCGAGGCGCC
 V S N K A L P A P T E K T I S K A K
 2459 ACATGACACAGGCGGCTCTGCGCACCTCTGCGCTGAGAGTGAACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGCGAGGCC
 G Q P
 2539 CHAGAACCCAGGTTGACACCTTGGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTTAGGCTTACCTGCTGCTGCA
 R E P Q V Y T L P F S R D E L T K N Q V S L T C L V K
 2619 AGGCTTCTATCCAGCGACATGCGCTGGAGTGGGAGAGCATGSGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCCG

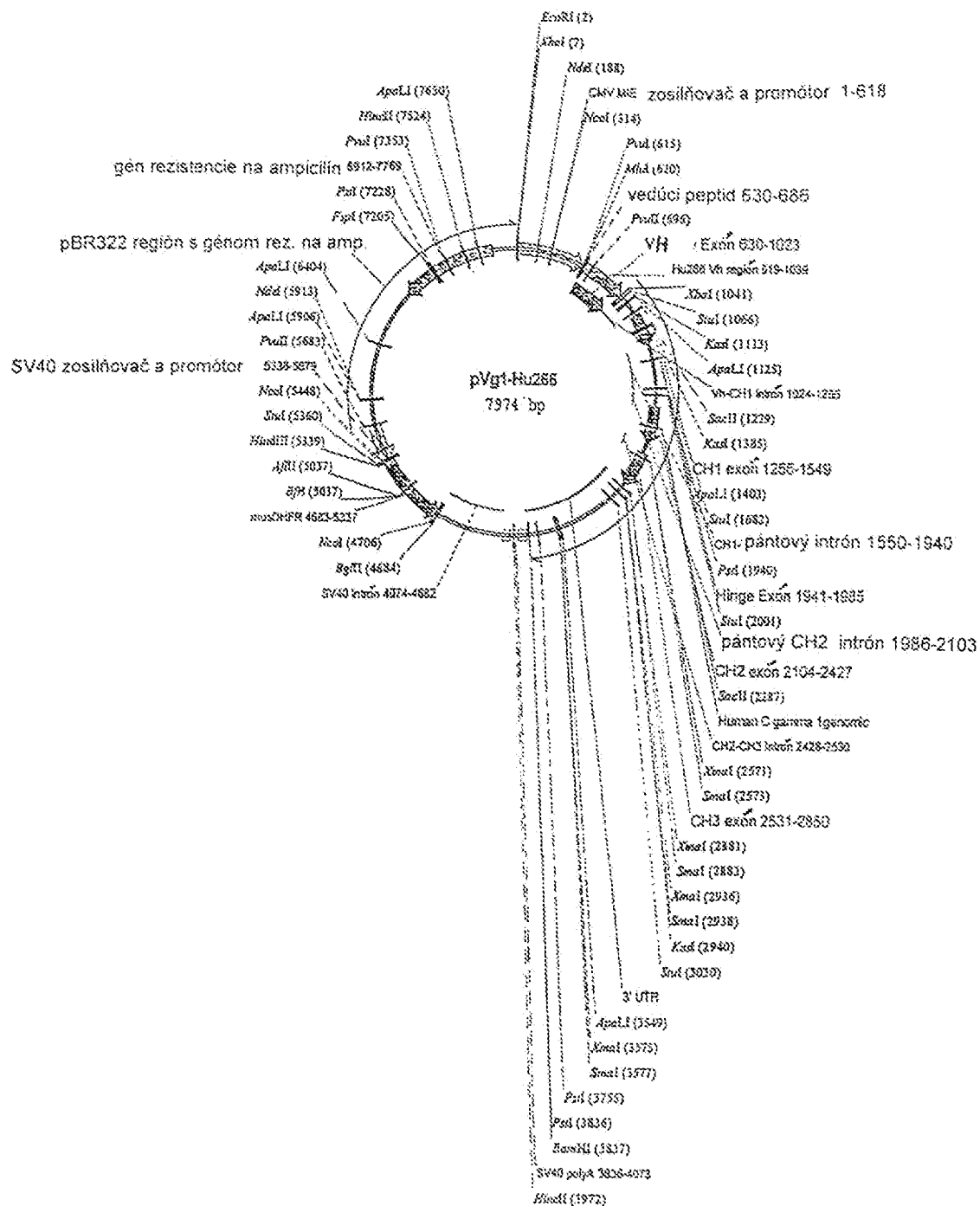
Obr. 5

G F Y P S D I A V E N E S N G Q P E N N Y K T T P P
 2699 TGCTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R N Q Q G N V F
 2779 TCATGCTCCGTGATCCATGAGGGCTTGGACAAACCACTACACGCAGAAAGGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTCGG
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S F G K *
 2859 ACGGCGGGCAAGCCCCGCTCCCGGGCTCTGCGGTGGCAGGAGATGCTTGGCAGGTADCCCTGTATACATACTTCCCG
 2939 GCGGCGGAGCATGGAATAAAGCAOCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCCTGCGACACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTCCAGGC
 3019 CGATCTGTAGGCTTGAATGGCATGAGGAGGCGAGAGGGGTCCCACTGTCCCACTGCTGCGCCAGGCTGTGAGGTGTGTC
 3099 CTGGGCGGCTTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCCCTGCGAGGGTGGGGATTTGCCAGCCGTGGCCCTCCCTCCAGC
 3179 AGCACCTGCCCCCTGGGCTGGGGCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCTTGGGGACAGACACACAGCCCTCCCTCTGTAGGAGAC
 3259 TGTCTGTTCGTGAGGCGCCCTGTCTCCGAACTCCATGCCCACTCGGGGGCATGGCTAGTCCATGTGGCTAGGGACAGG
 3339 CCTCTCTCAGCCATCTTACCCCCAGCGCACTAAGCCCTGGCTGCCCTGGCCAGCCCTGCGACCCGCTGGGGACACAGCG
 3419 ACTCCGGGACATGCACCTCTGGGGCCCTGTGGAGGGACTGGTGCAGATGCCACACACACACACTCAGTCCAGAACCCGTTCA
 3499 ACAGAACCCGCACTGAGGCTTGGCGGGCCACAGGCCACCCACACACACACAGTGCAGCCCTCAGACACAGGAGCCCTCAGCCCG
 3579 GCGAATGACACAGCAGCCAGAGCCAGAGCAAGGTCTGCGACACGTGAACACTCTCTGGACACAGGCCCCAGAGGCCCA
 3659 CGGGGACCTTCAGGCGCCACAGCCCTCTCGGGAGCTTCTCCACATGCTGACCTGTCTCAGACAAACCCAGCCCTCTCTCA
 3739 CAGGGTGGCCCTGCGAGCCGACACACACAGGGGATCAGACACCACTGACAGTCCCTGGCCCTGGCCACTTCCAG
 3819 TGCCGCTCTCCCTGCGAGGATCC

Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7