(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 028357 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.11.30

(21) Номер заявки
201171388

(22) Дата подачи заявки
2010.05.11

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ПРОТОФИБРИЛЛЯРНОЙ ФОРМЕ БЕТА-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА

(31) **0953133**
(32) **2009.05.12**
(33) **FR**
(43) **2012.05.30**
(86) **PCT/FR2010/050915**
(87) **WO 2010/130946 2010.11.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
Борен Николя, Бланш Франсис, Камерон Беатрис, Дюшен Марк, Миколь Венсан, Нэми Суад, Прадье Лоран, Ши И (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SCHUPF NICOLE ET AL.: "Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 16 SEP 2008, vol. 105, no. 37, 16 September 2008 (2008-09-16), pages 14052-14057, XP002567834 ISSN: 1091-6490, page 14056, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1

WO-A1-2007108755
WO-A1-2006081171
WO-A2-0246237
WO-A1-2005123775
WO-A2-2009065054

(57) Изобретение относится к гуманизированным антителам, специфичным к протофибриллярной форме бета-амилоидного пептида, содержащим CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:16, 18 и 20 соответственно, CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20 соответственно или CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 30 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20, которые связываются с пептидами A-β, агрегированными в сенильные бляшки, но не с диффузными отложениями пептидов A-β; а также к применению указанных антител в области болезни Альцгеймера.

028357 B1

028357 B1

Объектом настоящего изобретения являются гуманизированные антитела, специфичные к протофибриллярной форме β-амилоидного пептида. Объектом настоящего изобретения является также применение этих антител в терапии, диагностике и/или профилактике, в частности в связи с возникновением и развитием нейродегенеративных нарушений и/или заболеваний, связанных с отложением амилоидных бляшек, в частности с болезнью Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (AD) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое затрагивает значительную часть пожилого населения. Эта болезнь характеризуется в клиническом плане потерей памяти и ослаблением когнитивных функций, в невропатологическом плане присутствием в головном мозге нейрофибриллярных внутриклеточных отложений и внеклеточных отложений β-амилоидного пептида (A-β), образующих амилоидные бляшки (Yanker et al. Nature Med., vol 2, NO:8 (1996)). К этим признакам добавляется большое число других аномальных изменений, включая ухудшение иммунных и воспалительных систем, а также ухудшение митохондриальной функции, которые могут привести к повышению оксидативного стресса, активации механизмов апоптоза и в конечном счете к гибели клеток.

Амилоидные бляшки состоят в основном из пептидов A-β с 40 или 42 остатками, которые образуются в протеолитическом процессе белка-предшественника β-амилоидного пептида (APP). Внеклеточные отложения пептидов A-β представляют раннюю и неизменную характеристику всех форм AD, включая семейные формы (FAD). FAD появляются относительно рано (между 40 и 60 годами) и обусловлены мутациями в гене APP в 5% случаев FAD (у>20 семей) с шестью простыми или двойными миссенс-мутациями; в гене пресенилина-1 (PS-1) в 50-70% случаев FAD (у>200 семей) с более чем 80 различными мутациями, идентифицированными к настоящему времени; и в гене пресенилина-2 (PS-2) в меньшем числе случаев FAD с 2 миссенс-мутациями, описанных у 8 семей. Было продемонстрировано, что мутации в этих трех генах вызывают изменения в протеолизе APP, что ведет к сверхсинтезу A-β и раннему появлению патологии и симптомов, которые похожи на симптомы спорадических форм AD.

Токсичность амилоидных бляшек в нейронах коренится, по-видимому, в фибриллах со значительной молекулярной массой, которые образуются в результате агрегации растворимых пептидов A-β в фибриллярные формы, сначала растворимые (называемые также протофибриллярной формой), которые затем превращаются в нерастворимые формы в амилоидных бляшках. Действительно, было показано in vitro, что растворимый пептид A-β постепенно агрегировал в фибриллярную форму (c-a-d, которую можно выделить такими агентами, как конго красный или тиофлавин S, которые распознают третичные структуры в листке бета пептидов/белков) с высокой молекулярной массой (>200 кДа), но еще растворимую. Так как эта форма растворима, ее часто называют протофибриллярной формой, тогда как фибриллы, полученные в результате еще более сильной агрегации, ведут к потере растворимости. Переходные протофибриллярные формы обычно рассматривают как предшественники амилоидных волокон, которые могут быть ответственны за клеточные дисфункции и потерю нейронов при болезни Альцгеймера и при других заболеваниях, связанных с агрегацией белков.

Было показано, что сенильные амилоидные бляшки (то есть агрегированные, их называют также зрелыми бляшками) коррелируют с когнитивным статусом у пациентов с болезнью Альцгеймера в отличие от диффузных отложений пептида A-β, которые также широко присутствуют у пациентов, не затронутых этой болезнью (Duyckaerts et al., Neurobiol. Aging 1997; 18: 33-42 и Jellinger et al. 1998; 54:77-95). Таким образом, воздействие, в частности, на эти сенильные амилоидные бляшки позволит более специфически и эффективно лечить патологию Альцгеймера.

Было испытано много подходов для предотвращения образования пептидов A-β, как, например, ингибирующих процесс протеолиза APP.

Были испытаны такие стратегии иммунотерапии, как введение антител анти-Aβ (для уменьшения отложения амилоидов) или иммунизация антигенами пептидов A-β (чтобы стимулировать гуморальный ответ) в целях уменьшить размер и плотность бляшек.

Был, например, описан (США 7179463) способ лечения болезни Альцгеймера, включающий введение антител, направленных к протофибриллам, имеющим мутацию Arctic внутри области, кодирующей пептид A-β. Реально не было описано какого-либо примера антител. Кроме того, не было приведено какого-либо сравнения сродства антител к пептидам в зависимости от молекулярной массы этих пептидов. В других патентах (США 6761888 и 6750324) раскрыты антитела, распознающие различные эпитопы по длине аминокислотной последовательности пептида A-β_{42}. Была подана международная заявка (WO 2007/108756), относящаяся к антителам, специфичным к протофибриллам, но описанные антитела распознают одновременно пептиды A-β с высокой молекулярной массой и олигомеры со средней массой. Кроме того, ничего не говорится о сродстве антител к зрелым бляшкам в сравнении с их сродством к диффузным бляшкам.

Несмотря на современное развитие знаний о болезни Альцгеймера всегда имеется потребность в композициях и способах лечения и/или профилактики этой патологии при максимально ограниченных побочных эффектах. Антитела, которые описаны в настоящем изобретении, гуманизированные и специфичные к протофибриллярной форме пептидов A-β, имеют целью решить эту задачу. Позволяя распо-

знавать сенильные амилоидные бляшки, а не диффузные бляшки, антитела, являющиеся объектом настоящего изобретения, распознают патологические бляшки намного более эффективно, чем антитела, которые распознают все формы А-β и которые будут удерживаться по большей части на диффузных отложениях или на растворимых формах мономерного или низкомолекулярного пептида А-β.

Кроме того, благодаря распознаванию только протофибриллярных форм пептидов А-β, а не протофибриллярных форм других белков, не связанных с болезнью Альцгеймера, предотвращается ненужное связывание, способное уменьшить концентрацию антител, эффективных в отношении этого заболевания.

Гуманизированные мышиные антитела по всему настоящему описанию будут обозначаться как антитела 13С3.

Последовательности, которые могут кодировать или составлять гуманизированные антитела, являющиеся объектом настоящего изобретения, представлены в табл.2.

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, специфически связывающимся с протофибриллярной формой пептида А-β, т.е. с высокомолекулярным пептидом.

В более предпочтительном варианте антитела связываются с пептидом А-β, имеющим молекулярную массу выше 200, 300, 400 или 500 кДа.

Согласно одному варианту осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, связываются с пептидами А-β, агрегированными в сенильные бляшки, а не с диффузными отложениями пептидов А-β.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, специфически связываются с протофибриллярными формами пептида А-β, но не с другими белками амилоидной структуры (как, например, IAPP - Islet Amyloid Polypeptide, островковый амилоидный полипептид).

Настоящее изобретение относится также к гуманизированным антителам, имеющим сниженные эффекторные функции, что позволяет ограничить такие отрицательные эффекты, как появление микрокровотечений и вазогенных отеков.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, больше не обладают эффекторными функциями.

В еще более предпочтительном варианте осуществления антитела представляют собой иммуноглобулин G4, домен Fc которого подвергся мутациям, снижающим синтез полумолекул.

В еще более предпочтительном варианте осуществления антитела представляют собой иммуноглобулин G4, домен Fc которого подвергся мутациям, снижающим эффекторную активность.

Объектом настоящего изобретения являются гуманизированные антитела, содержащие

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:16, 18 и 20 соответственно,

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20 соответственно или

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 30 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20.

Объектом настоящего изобретение являются также гуманизированные антитела, содержащие CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 13, 15, 17 и 19 или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

В другом варианте осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, содержат CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 13, 31, 17 и 19 или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела содержат CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 29, 31, 17 и 19, или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, имеют вариабельную часть их тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:28.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела, являющиеся объектом изобретения, имеют вариабельную часть их легкой цепи (VL), которая содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 99%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:24.

В еще более предпочтительном варианте осуществления антитела имеют тяжелую цепь, имеющую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:28.

В другом варианте осуществления антитела имеют легкую цепь, имеющую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:24.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела содержат полипептидные последовательности SEQ ID NO:6 и 8.

В другом варианте осуществления антитела содержат полипептидные последовательности SEQ ID NO:6 и 24.

В другом варианте осуществления антитела содержат полипептидные последовательности SEQ ID NO:28 и 24.

Объектом настоящего изобретение являются также антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из полипептидных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:26.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела содержат легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из полипептидных последовательностей SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:22.

Другим объектом изобретения являются антитела, последовательность которых содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO:2 и 4.

Другим объектом изобретения являются антитела, последовательность которых содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO:2 и 22.

Другим объектом изобретения являются антитела, последовательность которых содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO:26 и 22.

Другим объектом изобретения являются гуманизированные антитела к пептиду А-β, имеющие сродство к протофибриллярной форме пептида А-β по меньшей мере в 100 раз выше их сродства к другим формам этого пептида.

Другим объектом изобретения являются антитела, характеризующиеся тем, что они вызывают уменьшение амилоидных бляшек.

Другим объектом изобретения является применение гуманизированных антител к пептиду А-β в лечении заболеваний, связанных с нейродегенеративными нарушениями, в частности в лечении болезни Альцгеймера.

Другим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированные антитела к пептиду А-β и эксципиенты.

Другим объектом изобретения является способ лечения болезни Альцгеймера, включающий введение пациенту гуманизированных антител антипептид А-β.

Другим объектом изобретения является клетка или клетки, продуцирующие гуманизированные антитела к пептиду А-β, а также способ получения этих антител, включающий культивирование указанных клеток. Такие клетки предпочтительно получают из одной клеточной линии.

Одним объектом изобретения является лекарственное средство, содержащее гуманизированные антитела к пептиду А-β.

Одним объектом изобретения является полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 22, 24, 26 или 28.

Другим объектом изобретения является полинуклеотид, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 21, 23, 25 или 27.

Другим объектом изобретения является рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 21, 23, 25 или 27, а также клетка-хозяина, содержащая указанный вектор.

Определения.

Специфическое связывание понимают как разницу по меньшей мере примерно в 10, 20, 30, 40, 50 или 100 раз между силой связи с одним рецептором по сравнению с другим, здесь между связыванием с протофибриллярной формой пептида А-β и связыванием с другими формами пептида.

Под "эпитопом" понимают участок антигена, с которым связываются антитела. Если антиген является полимером, таким как белок или полисахарид, эпитоп может быть образован смежными или несмежными остатками. Здесь эпитоп является конформационным, то есть связанным с трехмерной структурой протофибриллярного пептида А-β.

Под "протофибриллярной формой" понимают олигомерную форму пептидов А-β, растворимую in vitro, которую можно выделить как единое целое, с молекулярной массой выше 200, 300, 400 или 500 кДа, и которая может фиксировать такие агенты, как тиофлавин S или конго красный.

Под "сенильной бляшкой" понимают бляшку, состоящую из амилоидного ядра (фиксирующего тиофлавин S или конго красный), окруженного дистрофическими нейритами и продуктами реакций глиальных клеток. Сенильные бляшки находят, в частности, у пациентов с болезнью Альцгеймера в отличие от диффузных амилоидных отложений (не фиксирующих тиофлавин S или конго красный), которых гораздо больше, но которые не связаны с болезнью.

Антитела, называемые также иммуноглобулином, состоят из двух одинаковых тяжелых цепей ("CH") и двух одинаковых легких цепей ("CL"), которые связаны дисульфидным мостиком. Каждая цепь содержит константную область и вариабельную область. Каждая вариабельная область содержит три

сегмента, называемых "комплементарно-определяемыми областями" ("CDR") или "супервариабельными областями", которые в основном ответственны за связывание с эпитопом антигена.

Термин "VH" относится к вариабельным областям тяжелой цепи иммуноглобулина антитела, содержащего тяжелые цепи одного из фрагментов Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' или F(ab)'.

Термин "VL" относится к вариабельным областям легкой цепи иммуноглобулина антитела, включая легкие цепи фрагмента Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' или F(ab)'.

Под "антителом" понимают также любой функциональный фрагмент антител: Fab (Fragment antigen binding - антиген-связывающий фрагмент), Fv, scFv (single chain Fv -одноцепочечный Fv), Fc (кристаллизующийся фрагмент).

Предпочтительно эти функциональные фрагменты являются фрагментами типа Fv, scFv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc, диателами, полиспецифическими антителами (в частности, биспецифическими), синтетическими полипептидами, содержащими последовательности одной или нескольких CDR, которые обладают обычно такой же специфичностью фиксации, что и гуманизированные антитела, из которых они получены. Согласно настоящему изобретению фрагменты антител по изобретению могут быть получены из гуманизированных антител такими способами, как расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или разрыв дисульфидных мостиков в результате химического восстановления.

Нанотела также подпадают под это определение.

"Областями CDR" будут обозначаться гипервариабельные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, как определено Kabat и др. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5 Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 и более поздние издания). Существует 3 CDR тяжелой цепи и 3 CDR легкой цепи. Термин CDR используется здесь для обозначения в зависимости от конкретного случая одной или нескольких из этих областей или даже всех этих областей, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за родственное связывание антитела с антигеном или эпитопом, которые он распознал. Наиболее сохраняющиеся области вариабельных доменов называются областями или последовательностями FR от "framework" или "каркасными".

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам.

Под "гуманизированными антителами" понимают антитела, которые содержат главным образом последовательности человеческого иммуноглобулина. Этот термин относится также к иммуноглобулину, не являющемуся человеческим, который был модифицирован введением человеческих последовательностей или остатков, имеющихся в человеческих последовательностях.

Вообще говоря, гуманизированные антитела содержат один или обычно два вариабельных домена, в которых все или часть областей CDR соответствуют частям, полученным из исходной не человеческой последовательности, и в которых все или часть областей FR получены из последовательности человеческого иммуноглобулина. Таким образом, гуманизированные антитела могут содержать по меньшей мере один участок константной области иммуноглобулина (Fc), в частности выбранного базового человеческого иммуноглобулина.

Таким образом, необходимо получить антитела, которые будут минимально иммуногенными у человека. Так, возможно, чтобы одна или две аминокислоты одной или нескольких CDR были модифицированы аминокислотой, менее иммуногенной для хозяина-человека, без существенного снижения специфичности связи антител к высокомолекулярному пептиду A-β. Равным образом, остатки каркасных областей могут не быть человеческими, и разрешается, чтобы они не были модифицированы, так как они не вносят вклад в иммуногенный потенциал антител.

Существует несколько известных специалисту в данной области способов гуманизации, чтобы модифицировать исходные нечеловеческие антитела в антитела, менее иммуногенные для человека. Полная идентичность последовательности с антитела человека не является строго необходимой. Действительно, полная идентичность последовательности необязательно является индикатором, предсказывающим сниженную иммуногенность, и модификация ограниченного числа остатков может вести к гуманизированным антителам, имеющим очень ослабленный иммуногенный потенциал у человека (Molecular Immunology (2007) 44, 1986-1998).

Разными методами являются, например, инклюзия CDR (прививка) (EPO 0239400; WO 91/09967 и патенты США 5530101 и 5585089), изменение поверхности (EPO 0592106; EPO 0519596; Padlan, 1991, Molec. Imm. 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7 (6): 805-814 и Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973), а также смешение цепей (патент США 5565332).

Настоящее изобретение относится, в частности, к гуманизированным антителам, у которых вариабельные части модифицированы согласно технологии, раскрытой в международной патентной заявке WO 2009/032661.

В этом методе используют, в частности, моделирование молекулярной динамики исходя из трехмерных моделей антител, где указанные модели разработаны путем гомологии.

Настоящее изобретение относится также ко всем формам антител со сниженными эффекторными функциями, таким как иммуноглобулины, имеющие мутации в домене Fc, снижающие его сродство к рецепторам иммунной системы, или как нанотела.

Под "эффекторными функциями" понимают любую фиксацию домена Fc антитела к рецепторам

или белкам, вызывающую иммунные ответы. Ослабление этих эффекторных функций позволяет уменьшить такие осложнения, как возникновение микрокровотечений (Racke et al. J Neurosci 2005, 25:629).

Сродство может быть измерено любым методом, известным специалисту в данной области. Предпочтительно измерять его методом Biostat Speed, разработанным исходя из алгоритмов, описанных Ratkovsky DA и Reedy TJ (Biometries, 1986, 42, 575-82).

Чтобы можно было экспрессировать тяжелые цепи и/или легкие цепи антител, являющихся объектом изобретения, полинуклеотиды, кодирующие указанные цепи, вводят в экспрессионные векторы. Эти экспрессионные векторы могут быть плазмидами, YAC, космидами, ретровирусами, эписомами, производными от EBV и любым другим вектором, который специалист в данной области сможет посчитать подходящим для указанных цепей.

Эти векторы могут быть использованы для трансформации клеток, полученных предпочтительно из одной клеточной линии. Еще более предпочтительно такая клеточная линия получена от млекопитающего.

Предпочтительно эта линия представляет собой линию CHO или линию, производную от этой линии, или линию HEK293 или линию, производную от этой линии.

Трансформация клеток может быть осуществлена любым способом, известным специалисту в данной области, чтобы ввести полинуклеотиды в клетку-хозяина. Одним таким способом может быть трансформация с помощью декстрана, осаждение фосфатом кальция, трансфекция с помощью полибрена, слияние протопластов, электропорация, инкапсуляция полинуклеотидов в липосомах, биолистическая инъекция и прямая микроинъекция ДНК в ядро.

Антитела, являющиеся объектом изобретения, могут содержаться в фармацевтических композициях для местного введения, пероральным, парентеральным, интраназальным, внутривенным, внутримышечным, подкожных, внутриглазным и т.д. способами.

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые носители для препаратов, годных для инъекции. Это могут быть, в частности, солевые растворы (мононатрийфосфат, динатрийфосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.д. или смеси таких солей), стерильные, изотонические или сухие композиции, в частности лиофилизованные, которые при добавлении в зависимости от конкретного случая стерилизованной воды или физиологического раствора позволяют создать пригодные для инъекций растворы.

В качестве примера фармацевтическая композиция содержит 1) фосфатный буфер Dulbecco (pH ~7,4), необязательно содержащий от 1 до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, 2) 0,9% (мас./об.) хлорида натрия (NaCl)) и 3) 5% (мас./об.) декстрозы. Она может также содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизатор, такой как Tween 20.

Рассматриваемыми патологиями могут быть любые заболевания, связанные с отложением амилоидных бляшек. В частности, целевой патологией является болезнь Альцгеймера.

Дозы зависят от желаемого эффекта, длительности лечения и способа введения; обычно они составляют от 5 до 1000 мг антител в сутки для взрослого. Обычно врач определяет подходящую дозировку в зависимости от стадии заболевания, возраста пациента, его массы или любых других факторов, которые следует учитывать в зависимости от пациента.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами, однако не ограничено ими.

Краткое описание фигур

Фиг. 1A. Карта плазмиды pXL4973, позволяющей экспрессию легкой цепи LC1 антител анти-Aβ 13C3-VH1VL1.

Фиг. 1B. Карта плазмиды pXL4 97 9, позволяющей экспрессию тяжелой цепи HCl антител анти-Aβ 13C3-VH1VL1.

Фиг. 2A и 2B. Разделение протофибрилл и низкомолекулярных олигомеров гель-хроматографией на Superdex 75 (соответственно при t=0 и t=16 ч).

Фиг. 3. Определение молекулярной массы протофибрилл.

Фиг. 4A, 4B и 4C. Определение сродства гуманизированных антител (соответственно антител LP09027 (4A), LP09026 (4B) и LP09028 (4C)) к протофибриллам (среднее по 3 экспериментам±среднеквадратичная погрешность).

Фиг. 5. Специфичность гуманизированных антител LP09027 по отношению к фибриллам A-β.

Фиг. 6A и 6B. Специфичность гуманизированных антител (LP09027) к зрелым сенильным бляшкам соответственно для фронтального кортекса (6A) и гиппокампа (6B) мыши. Стрелки указывают на сенильные бляшки.

Примеры

Пример 1. Получение гуманизированных антител.

Были гуманизированы мышиные антитела 13C3.

Данный пример описывает последовательность и получение гуманизированных антител к пептиду A-β, VH1VL1 (LP09027) путем продуцирования в переходной экспрессии в линии млекопитающего HEK293, называемой Freestyle 293-F.

кДНК, кодирующие гуманизированные вариабельные цепи VL1 и VH1, подвергали слиянию с кДНК, кодирующими константные области человеческих Ckappa и lgG4 соответственно. Последовательность константной области lgG4 представляет собой последовательность варианта, имеющего замещения S241P и L248E, согласно номенклатуре Kabat, чтобы существенно снизить продуцирование полумолекул (Angla et al., 1993, Mol. Immunol., 30: 105-108) и эффекторные функции (WO 97/09351).

Нуклеиновые последовательности, кодирующие CH1 (SEQ ID NO:1) и CL1 (SEQ ID NO:3), клонировали независимо в экспрессионном векторе, чтобы образовать соответственно плазмиды pXL4973 (фиг. 1A) и pXL4979 (фиг. 1B).

Одну серию антител получали путем продуцирования в переходной экспрессии в линии Freestyle 293-F (Invitrogen) после ко-трансфекции плазмид pXL4973 и pXL4 979 согласно протоколу, описанному Invitrogen (номер в каталоге K9000-01). Эту серию (LP09027) затем очищали методом афинной хроматографии на колонке геля MabSelect (Amersham) согласно рекомендациям поставщика, затем смешивали с буфером PBS (Dulbecco, индекс 14190-094) и стерилизовали фильтрованием (0,2 мкм). Из 1 л культуры путем денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле и пространственно-эксклюзионной хроматографии получали 33 мг антител чистотой 97%. Масса, полученная денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле и по ЖХ/МС, согласуется с первичной последовательностью аминокислот и присутствием N-гликана в домене Fc, то есть масса 23969 Да для LC1 и 49650 Да для HCl, учитывая N-гликан в форме G0F. Масса, полученная электрофорезом в полиакриламидном геле без денатурирующих условий и по эксклюзионной хроматографии, согласуется с гетеротетрамерной структурой антител массой 150 кДа (фиг. 4A).

Этим же способом получали серии гуманизированных антител LP09026 и LP09028 исходя из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:21 для LP09026 (фиг. 4B) и SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:21 для LP09028 (фиг. 4C).

Пример 2. Получение протофибрилл из пептида Aβ1-42.

Протофибриллы получали из синтетических пептидов Aβ1-42 согласно способу, описанному Johansson et al. (FEBS, 2006, 2618-2630). Лиофилизованный пептид (Anaspec, индекс 24224) растворяли в 10 мМ NaOH до концентрации 100 мкМ, затем перемешивали в течение 1 мин и инкубировали на стекле в течение 10 мин. Раствор пептида разводили затем буфером (100 мМ фосфат натрия, 200 мМ NaCl pH 7,4) до концентрации 50 мкМ, затем перемешивали одну минуту. Препарат инкубировали в течение ночи при 37°C, чтобы достичь образования протофибрилл, затем центрифугировали при 17900 g в течение 15 мин при 16°C для удаления нерастворимых агрегатов. Чтобы отделить протофибриллы олигомерных форм A-β с низкой молекулярной массой, супернатант вводили в гель-хроматографическую колонку Superdex 75, уравновешенную в буфере (50 мМ ацетата аммония pH 8,5). Фракции, соответствующие протофибриллам и низкомолекулярным олигомерам, собирали и хранили при 4°C. На фиг. 2 показан типичный профиль разделения протофибрилл. Молекулярную массу протофибрилл определяли по гель-хроматографии на Superdex200, используя в качестве индикатора молекулярной массы калибровочный набор Biorad (индекс 150-1901). Фиг. 3 показывает, что молекулярная масса протофибрилл выше 200 кДа.

Пример 3. Специфичность и сродство гуманизированных антител к протофибриллам.

50 мкл протофибрилл и низкомолекулярных олигомеров при концентрации 1 мкг/мл в PBS (Gibco, индекс 70011) помещали в лунки планшета ELISA (Nunc, индекс 442404) и инкубировали при 4°C в течение ночи. После удаления избытка антигенов в каждую лунку помещали 200 мкл буфера PBS+5% сухого молока (мас./об.), чтобы ликвидировать неспецифическую адсорбцию, и инкубировали 2 ч при температуре окружающей среды. Затем лунки промывали 4 раза 300 мкл буфера PBS Tween 0,02%. В каждую лунку добавляли 50 мкл раствора первичных антител (трехкратное разведение в 3 раза в PBS Tween исходя из концентрации 100 мкг/мл для олигомеров и 25 мкг/мл для протофибрилл) и инкубировали 1 ч при температуре окружающей среды. Лунки промывали 4 раза 300 мкл буфера PBS Tween. Вторичные человеческие антитела анти-Fc, комбинированные с пероксидазой (Goat Anti Human IgG (Fc) peroxidase conjugated, Pierce, индекс 31413), разведенные до 1/10000 в буфере PBS Tween, добавляли в каждую лунку и инкубировали 1 ч при температуре окружающей среды. После 4 промывок 300 мкл PBS Tween в каждую лунку добавляли 100 мкл TMB (Interchim, индекс UP664782) и инкубировали в течение примерно 10 мин, затем реакцию останавливали 1M раствором HCl (Interchim, индекс UPS29590), и планшеты считывали при OD, измеренной на длине волны 450 нм. Значения EC_{50} определяли на BioStat Speed. Полученные результаты приведены в табл.1, а также на фиг. 4, и показывают очень высокую специфичность антител к протофибриллам по сравнению с низкомолекулярными олигомерами (в 184 раза выше).

Таблица 1

EC_{50} (мкг/мл)	LMW	PF	LMW/PF
LP09026	41,4±40,1	0,0587±0,004	705,3
LP09027	14,7±2,7	0,0798±0,007	184,2
LP09028	21,8±5,3	0,0892±0,007	244,4

Лиофилизованный пептид Aβ1-42 (Anaspec, индекс 24224) растворяют согласно рекомендациям поставщика: 40 мкл 1%-ного NH_4OH добавляли к 500 мкг Aβ1-42. После завершения растворения добавля-

ли 460 мкл PBS, чтобы получить концентрацию 1 мг/мл. Готовили аликвоты 10 мкл и хранили при -80°C. В лунки планшета ELISA помещали 50 мкл раствора пептида Aβ1-42 концентрацией 1 мкг/мл в карбонатном буфере ($NaHCO_3$ 0,025M (Acros Organics, индекс 217120010), Na_2CO_3 0,025M (Acros Organics, индекс 207810010), pH 9,7 и инкубировали в течение ночи при температуре окружающей среды. Как и выше, лунки промывали буфером PBS Tween, инкубировали в присутствии буфера PBS+5% сухого молока (мас./об.), и промывали буфером PBS Tween. Гуманизированные антитела в концентрации 0,02 мкг/мл инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды с несколькими концентрациями (начиная с 1 мкг/мл) пептидов Aβ1-28 (Bachem, индекс H7865), Aβ1-16 (Anaspec, индекс 24225), Aβ25-35 (Anaspec, индекс 24227), низкомолекулярных олигомеров или протофибрилл, полученных, как описано выше. Затем в каждую лунку помещали смесь антитела/антиген, и микротитровальный планшет инкубировали 1 ч при температуре окружающей среды. Свободные несвязанные антитела определяли по тому же протоколу ELISA, как описано выше. Эти конкурентные эксперименты показывают, что только протофибриллы с намного более сильным сродством, чем у низкомолекулярных олигомеров, способны нейтрализовать гуманизированные антитела, препятствуя взаимодействию с пептидом Aβ1-42, и никакой пептид не способен нейтрализовать антитела.

Пример 4. Специфичность гуманизированных антител LP09027 к фибриллам Aβ1-42.

Пептид Aβ1-42 (Anaspec, 20276) растворяли в 200 мкл NaOH 10 мМ до концентрации 5 мг/мл. Пептид IAPP (Anaspec, 60804) растворяют в 200 мкл 50%-ного ДМСО до концентрации 5 мг/мл. 100 мкл каждого препарата растворяли в 400 мкл PBS 1,25X. Конечная концентрация пептидов составляла 1 мг/мл в 500 мкл. Образцы инкубировали 72 ч при 37°C. После инкубации образцы центрифугировали при 17900 g в течение 30 мин при 4°C. Супернатант удаляли, и осадок промывали 3 раза PBS 1X. После последней промывки осадок фибрилл вводили в 150 мкл PBS. Чтобы проконтролировать присутствие фибрилл амилоидного типа, проводили тест на флуоресценцию тиофлавина T (Anaspec, 88306). 20 мкл тиофлавина T (конечная концентрация 20 мкМ), 10 мкл образца и 70 мкл PBS IX (конечный объем 100 мкл) смешивают в лунке черного планшета (Corning, 3792). Тиофлавин T возбуждался на 450 нм и в присутствии структуры амилоидного типа флуоресцировал на 482 нм. В каждую лунку микротитровального планшета помещали 50 мкл фибрилл Aβ1-42 концентрацией 1 мкг/мл и IAPP концентрацией 0,5 мкг/мл. Применяли протокол ELISA, используя последовательное разбавление гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл. Фиг. 5 показывает, что гуманизированные антитела LP0 9027 специфически распознают фибриллы Aβ1-42, но не фибриллы IAPP.

Пример 5. Специфичность гуманизированных антител LP09027 к зрелым сенильным бляшкам, но не к диффузным бляшкам.

Гуманизированные антитела (LP09027), сопряженные с дигоксигенином (N-гидроксисукцинимидный эфир дигоксигенин-3-O-метилкарбонил-ε-аминокапроновой кислоты: Roche 11333054001; 11418165001) использовали в иммуногистохимии (Robot Ventana) на срезах головного мозга мышей APP PS1 (модель Альцгеймера, описанная Schmitz C. et al., Am. J. Pathol, 2004, 164, 1495-1502)), а также на срезах головного мозга человека (церебральный кортекс), взятых у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. Образцы предварительно фиксировали в формалине и вводили в парафин.

Результаты, полученные на мышах (фиг. 6A и 6B), четко показывают, что гуманизированные антитела распознают исключительно зрелые и плотные сенильные бляшки, но не диффузные отложения пептида A-β.

Эти данные коррелируют со свойствами антител, которые являются специфическими к протофибриллярной форме A-β и, следовательно, не распознают растворимые, мономерные или олигомерные, формы этого пептида.

Таблица 2

	Нуклеотидные последовательности	Белковые последовательности
Антитела 1 VH1VL1		
VH_1+CH_1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
VL_1+CL_1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
VH_1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
VL_1	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
CDR VH_1	SEQ ID NO:9, 11, 13	SEQ ID NO:10, 12, 14
CDR VL_1	SEQ ID NO:15, 17, 19	SEQ ID NO:16, 18, 20
Антитела 2 VH1 VL2		
VH_1+CH_1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
VL_2+CL_2	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
VH_1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
VL_2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
CDR VH_1	SEQ ID NO:9, 11, 13	SEQ ID NO:10, 12, 14
CDR VL_2	SEQ ID NO:31, 17, 19	SEQ ID NO:32, 18, 20
Антитела 3 VH2 VL2		
VH_2+CH_2	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
VL_2+CL_2	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
VH_2	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
VL_2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
CDR VH_2	SEQ ID NO:9, 11, 29	SEQ ID NO:10, 12, 30
CDR VL_2	SEQ ID NO:31, 17, 19	SEQ ID NO:32, 18, 20

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> Гуманизированные антитела, специфичные к протофибриллярной форме бета-амилоидного пептида

<130> FR2009-054

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1326
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1326)

<400> 1

```
gag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag gtg gtg aag cct ggg gtc       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Val
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

gct atg cac tgg gtg aag cag agt cct ggc aag agt ctg gag tgg att      144
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga gtt att agt act aag tat ggt aag aca aac tac aac ccc agc ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
    50                  55                  60

cag ggc cag gcc aca atg act gtt gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat      240
```

```
Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gag ctt gcc agc ttg aag gcc tcc gat tct gcc atc tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga ggg gac gat ggt tat tcc tgg ggt caa gga acc tca gtc acc      336
Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc agc gct tct acc aag ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct      384
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        115                 120                 125

tgc tcc cgg tcc acc tcc gag tcc acc gcc gct ctg ggc tgc ctg gtg      432
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

aag gac tac ttc cct gag cct gtg acc gtg tcc tgg aac tct ggc gcc      480
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

ctg acc tcc ggc gtg cac acc ttc cct gcc gtg ctg cag tcc tcc ggc      528
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                165                 170                 175

ctg tac tcc ctg tcc tcc gtg gtg acc gtg cct tcc tcc tcc ctg ggc      576
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            180                 185                 190

acc aag acc tac acc tgt aac gtg gac cac aag cct tcc aac acc aag      624
Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        195                 200                 205

gtg gac aag cgg gtg gag tcc aag tac ggc cct cct tgc cct ccc tgc      672
Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

cct gcc cct gag ttc gag ggc gga cct agc gtg ttc ctg ttc cct cct      720
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

aag cct aag gac acc ctg atg atc tcc cgg acc cct gag gtg acc tgt      768
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255

gtg gtg gtg gac gtg tcc cag gag gac cct gag gtc cag ttc aac tgg      816
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
            260                 265                 270

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc aag acc aag cct cgg gag      864
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

gag cag ttc aat tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg acc gtg ctg      912
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

cac cag gac tgg ctg aac ggc aaa gaa tac aag tgt aag gtc tcc aac      960
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305                 310                 315                 320
```

```
aag ggc ctg ccc tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aag gcc aag ggc     1008
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

cag cct agg gag cct cag gtg tac acc ctg cct cct agc cag gaa gag     1056
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
            340                 345                 350

atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac     1104
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

cct tcc gac atc gcc gtg gag tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac     1152
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

aac tac aag acc acc cct cct gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc     1200
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

ctg tac tcc agg ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg cag gag ggc aac     1248
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
                405                 410                 415

gtc ttt tcc tgc tcc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc     1296
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

cag aag tcc ctg tcc ctg tct ctg ggc tga                             1326
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
        435                 440
```

<210> 2
<211> 441
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 2

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Phe Glu 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu
            340                 345                 350

Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
        435                 440
```

<210> 3
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(660)

<400> 3

```
gag atc gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga       48
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

gat aga gcc tcc atc tct tgc aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt       96
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

aat gga aac acc tat ctg cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca aag ctc ctg atc tat aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc ccg      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg tca gat ttc aca ctc acc atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80
```

```
agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
                85                  90                  95

aca ttt gtt cct tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag      384
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc      432
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa      480
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc      528
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag      576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg      624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga                      660
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 4
<211> 219
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 4

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 5
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)

<400> 5

```
gag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag gtg gtg aag cct ggg gtc       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Val
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

gct atg cac tgg gtg aag cag agt cct ggc aag agt ctg gag tgg att      144
```

```
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga gtt att agt act aag tat ggt aag aca aac tac aac ccc agc ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
    50                  55                  60

cag ggc cag gcc aca atg act gtt gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat      240
Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gag ctt gcc agc ttg aag gcc tcc gat tct gcc atc tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga ggg gac gat ggt tat tcc tgg ggt caa gga acc tca gtc acc      336
Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc agc                                                         345
Val Ser Ser
        115
```

<210> 6
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 6

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Val Ser Ser
```

115

<210> 7
<211> 339
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 7

```
gag atc gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga       48
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

gat aga gcc tcc atc tct tgc aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt       96
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

aat gga aac acc tat ctg cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca aag ctc ctg atc tat aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc ccg      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg tca gat ttc aca ctc acc atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
                85                  90                  95

aca ttt gtt cct tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgt                                                                  339
Arg
```

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 8

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15
```

```
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

Arg
```

<210> 9
<211> 33
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<400> 9

```
tcc ggc tac aca ttc act gat tat gct atg cac                          33
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1               5                   10
```

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 10

```
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1               5                   10
```

<210> 11
<211> 30
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(30)

<400> 11
gtt att agt act aag tat ggt aag aca aac 30
Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 12

Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 18
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 13
ggg gac gat ggt tat tcc 18
Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 14

Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
1 5

<210> 15
<211> 48
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(48)

<400> 15
aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aac acc tat ctg cat 48
Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 17
<211> 24
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(24)

<400> 17
aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg 24
Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 18

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
1 5

<210> 19
<211> 27
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 19
tct caa aat aca ttt gtt cct tgg acg 27
Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20

Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 21
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(660)

<400> 21

```
gag atc gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga       48
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

gat aga gcc tcc atc tct tgc aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt       96
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

aat acc aac acc tat ctg cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca aag ctc ctg atc tat aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc ccg      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg tca gat ttc aca ctc acc atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
                85                  90                  95

aca ttt gtt cct tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag      384
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc      432
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa      480
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc      528
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag      576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190
```

```
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg      624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga                      660
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 22
<211> 219
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 22

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 23
<211> 339
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 23

```
gag atc gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga       48
Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

gat aga gcc tcc atc tct tgc aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt       96
Asp Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

aat acc aac acc tat ctg cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca aag ctc ctg atc tat aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc ccg      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg tca gat ttc aca ctc acc atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
                85                  90                  95

aca ttt gtt cct tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgt                                                                  339
Arg
```

<210> 24
<211> 113
<212> PRT

<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 25
<211> 1326
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1326)

<400> 25
gag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag gtg gtg aag cct ggg gtc 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Val
1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

gct atg cac tgg gtg aag cag agt cct ggc aag agt ctg gag tgg att 144
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

```
        35                  40                  45

gga gtt att agt act aag tat ggt aag aca aac tac aac ccc agc ttt      192
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
    50                  55                  60

cag ggc cag gcc aca atg act gtt gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat      240
Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gag ctt gcc agc ttg aag gcc tcc gat tct gcc atc tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga ggg gac gag ggt tat tcc tgg ggt caa gga acc tca gtc acc      336
Ala Arg Gly Asp Glu Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc agc gct tct acc aag ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct      384
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        115                 120                 125

tgc tcc cgg tcc acc tcc gag tcc acc gcc gct ctg ggc tgc ctg gtg      432
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

aag gac tac ttc cct gag cct gtg acc gtg tcc tgg aac tct ggc gcc      480
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

ctg acc tcc ggc gtg cac acc ttc cct gcc gtg ctg cag tcc tcc ggc      528
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                165                 170                 175

ctg tac tcc ctg tcc tcc gtg gtg acc gtg cct tcc tcc tcc ctg ggc      576
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            180                 185                 190

acc aag acc tac acc tgt aac gtg gac cac aag cct tcc aac acc aag      624
Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        195                 200                 205

gtg gac aag cgg gtg gag tcc aag tac ggc cct cct tgc cct ccc tgc      672
Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

cct gcc cct gag ttc gag ggc gga cct agc gtg ttc ctg ttc cct cct      720
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

aag cct aag gac acc ctg atg atc tcc cgg acc cct gag gtg acc tgt      768
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255

gtg gtg gtg gac gtg tcc cag gag gac cct gag gtc cag ttc aac tgg      816
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
            260                 265                 270

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac aac gcc aag acc aag cct cgg gag      864
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

gag cag ttc aat tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg acc gtg ctg      912
```

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

cac cag gac tgg ctg aac ggc aaa gaa tac aag tgt aag gtc tcc aac      960
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305                 310                 315                 320

aag ggc ctg ccc tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aag gcc aag ggc     1008
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

cag cct agg gag cct cag gtg tac acc ctg cct cct agc cag gaa gag     1056
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
            340                 345                 350

atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac     1104
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

cct tcc gac atc gcc gtg gag tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac     1152
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

aac tac aag acc acc cct cct gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc     1200
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385                 390                 395                 400

ctg tac tcc agg ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg cag gag ggc aac     1248
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
                405                 410                 415

gtc ttt tcc tgc tcc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc     1296
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

cag aag tcc ctg tcc ctg tct ctg ggc tga                             1326
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
        435                 440
```

<210> 26
<211> 441
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 26

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
```

```
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Phe Glu 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu
            340                 345                 350

Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
        435                 440
```

<210> 27
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированная последовательность

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)

<400> 27

```
gag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag gtg gtg aag cct ggg gtc       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Val
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc act gat tat       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

gct atg cac tgg gtg aag cag agt cct ggc aag agt ctg gag tgg att      144
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga gtt att agt act aag tat ggt aag aca aac tac aac ccc agc ttt      192
```

```
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
    50                  55                  60

cag ggc cag gcc aca atg act gtt gac aaa tcc tcc agc aca gcc tat      240
Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gag ctt gcc agc ttg aag gcc tcc gat tct gcc atc tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga ggg gac gag ggt tat tcc tgg ggt caa gga acc tca gtc acc      336
Ala Arg Gly Asp Glu Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc agc                                                         345
Val Ser Ser
        115
```

<210> 28
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 28

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Val Ser Ser
        115
```

<210> 29

<211> 18
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 29
ggg gac gag ggt tat tcc 18
Gly Asp Glu Gly Tyr Ser
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 30

Gly Asp Glu Gly Tyr Ser
1 5

<210> 31
<211> 48
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(48)

<400> 31
aga tct ggt cag agc ctt gtg cac agt aat acc aac acc tat ctg cat 48
Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 32

Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, специфичное к протофибриллярной форме пептида A-β, отличающееся тем, что указанное антитело содержит

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:16, 18 и 20 соответственно,

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 14 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20 соответственно или

CDR 1-3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO:10, 12 и 30 соответственно и CDR 1-3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO:32, 18 и 20, и

отличающееся тем, что оно связывается с пептидами A-β, агрегированными в сенильные бляшки, но не с диффузными отложениями пептидов A-β.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что оно содержит CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 13, 15, 17 и 19 или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что оно содержит CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 13, 31, 17 и 19 или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

4. Антитело по п.1, отличающееся тем, что оно содержит CDR, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:9, 11, 29, 31, 17 и 19 или последовательностями, отличающимися соответственно на 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов от указанных последовательностей.

5. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что вариабельная часть его тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:28.

6. Антитело по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что вариабельная часть его легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 99%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:24.

7. Антитело по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь, имеющую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:28.

8. Антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что оно содержит легкую цепь, имеющую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:24.

9. Антитело по любому из пп.5-8, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную часть тяжелой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:6 и вариабельную часть легкой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:8.

10. Антитело по любому из пп.5-8, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную часть тяжелой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:6 и вариабельную часть легкой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:24.

11. Антитело по любому из пп.5-8, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную часть тяжелой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:28 и вариабельную часть легкой цепи полипептидной последовательности SEQ ID NO:24.

12. Антитело по любому из пп.1-11, отличающиееся тем, что оно содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из полипептидных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:26.

13. Антитело по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что оно содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из полипептидных последовательностей SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:22.

14. Антитело по п.12 или 13, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:2 и легкую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:4.

15. Антитело по п.12 или 13, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:2 и легкую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:22.

16. Антитело по п.12 или 13, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:26 и легкую цепь полипептидной последовательности SEQ ID NO:22.

17. Антитело по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что оно вызывает уменьшение амилоидных бляшек.

18. Антитело по любому из пп.1-17, отличающееся тем, что его сродство к протофибриллярной форме пептида A-β по меньшей мере в 100 раз выше его сродства к другим формам этого пептида.

19. Гуманизированное антитело, специфичное к протофибриллярной форме пептида A-β, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь, включающую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:6, и легкую цепь, включающую вариабельную часть с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:8.

20. Антитело по п.19, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь, включающую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2, и легкую цепь, включающую полипептидную последовательность SEQ ID NO:4.

21. Антитело по п.19, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO:2, и легкую цепь, состоящую из полипептидной последовательности SEQ ID NO:4.

22. Применение антитела по любому из пп.1-21 в лечении заболеваний, связанных с нейродегенера-

тивными нарушениями.

23. Применение антитела по любому из пп.1-21 в лечении болезни Альцгеймера.

24. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболеваний, связанных с нейродегенеративными нарушениями, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп.1-21 и эксципиенты.

25. Способ лечения болезни Альцгеймера, отличающийся тем, что он включает введение пациенту антител по любому из пп.1-21.

26. Клетка, продуцирующая антитело по любому из пп.1-21, отличающаяся тем, что указанная клетка трансформирована вектором, обеспечивающим экспрессию тяжелой и легкой цепей указанного антитела.

27. Способ получения антитела по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что он включает культивирование клеток по п.26 и очистку антитела из указанной культуры клеток.

28. Лекарственное средство для лечения или профилактики заболеваний, связанных с нейродегенеративными нарушениями, содержащее антитело по любому из пп.1-21.

29. Полинуклеотид для экспрессии тяжелых цепей антитела по п.1, кодирующий полипептид, имеющий по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:2, 6, 26 или 28.

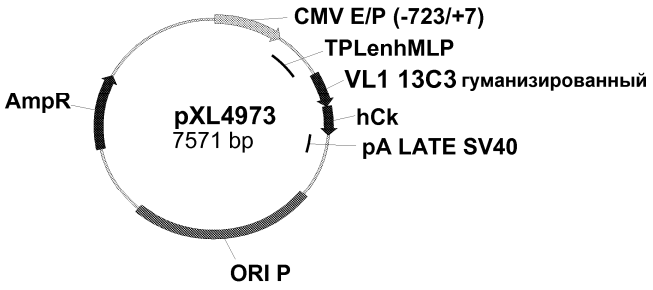
30. Полинуклеотид для экспрессии легких цепей антитела по п.1, кодирующий полипептид, имеющий по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:4, 8, 22 или 24.

31. Полинуклеотид для экспрессии тяжелых цепей антитела по п.1, отличающийся тем, что он содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:1, 5, 25 или 27.

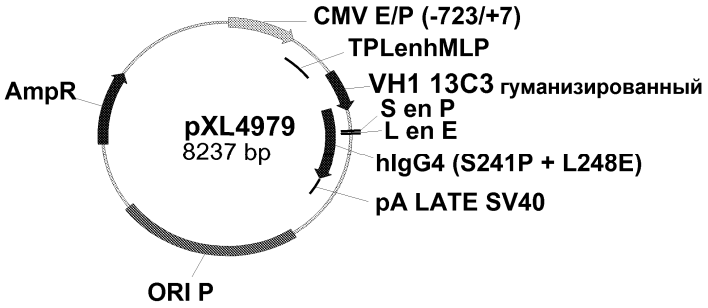
32. Полинуклеотид для экспрессии легких цепей антитела по п.1, отличающийся тем, что он содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%-ную идентичность с одной из последовательностей SEQ ID NO:3, 7, 21 или 23.

33. Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.29-32.

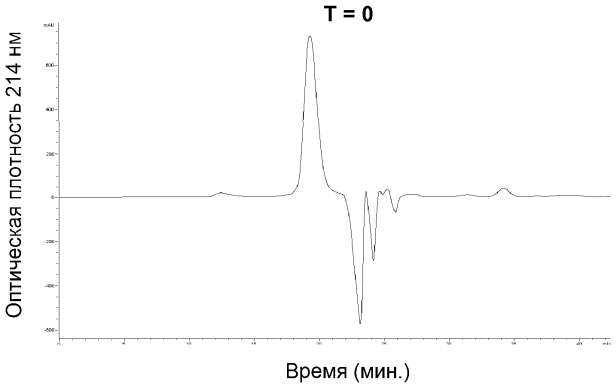
34. Клетка-хозяина для продуцирования гуманизированного антитела, специфичного к протофибриллярной форме пептида A-β, содержащая вектор по п.33.



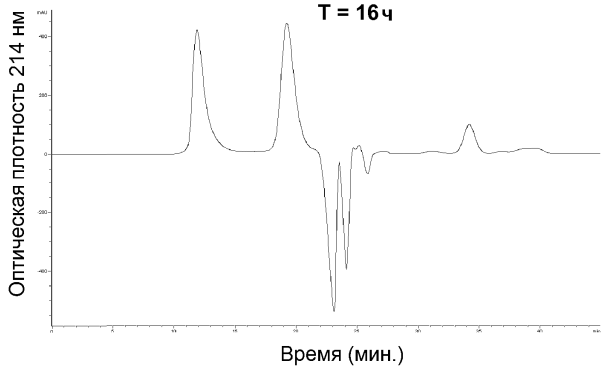
Фиг. 1A



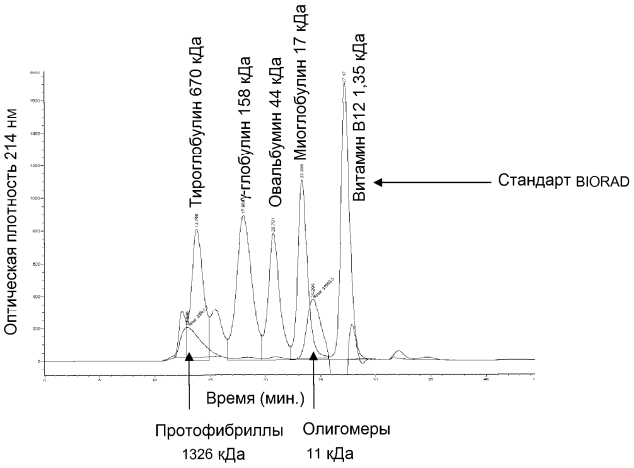
Фиг. 1B



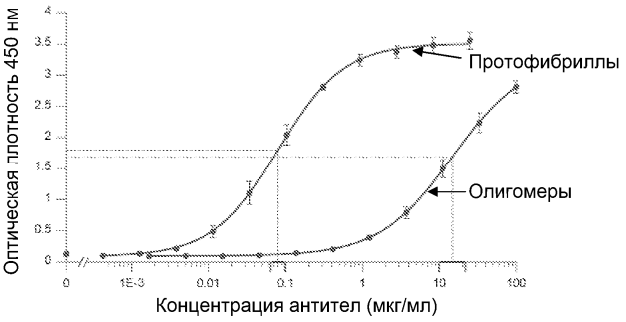
Фиг. 2А



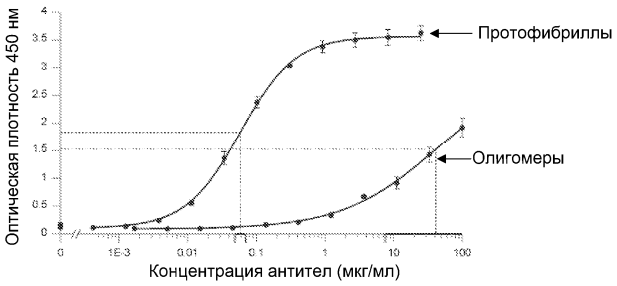
Фиг. 2В



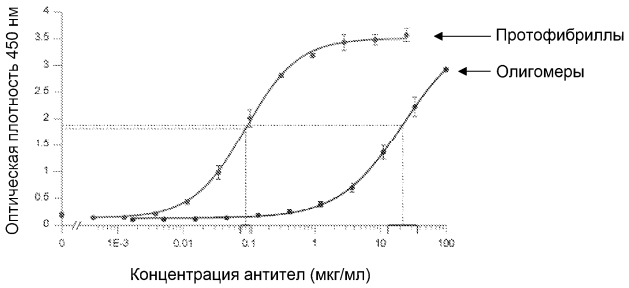
Фиг. 3



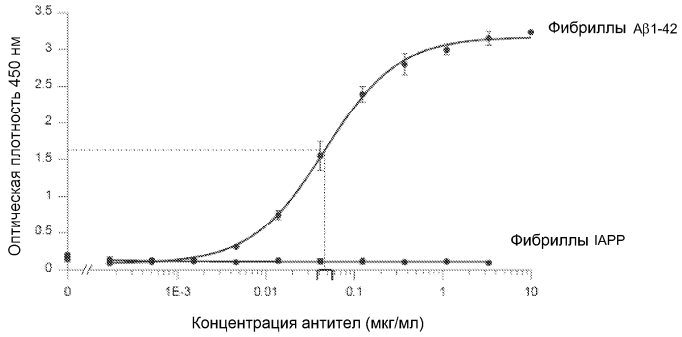
Фиг. 4А



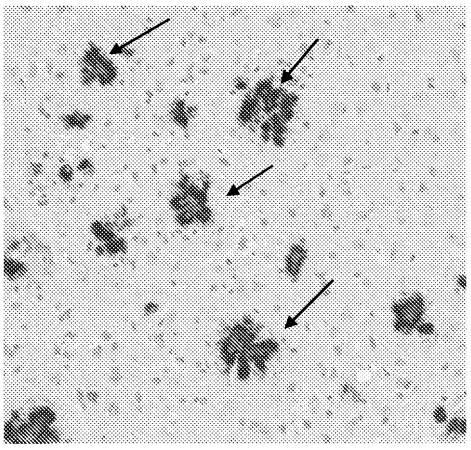
Фиг. 4B



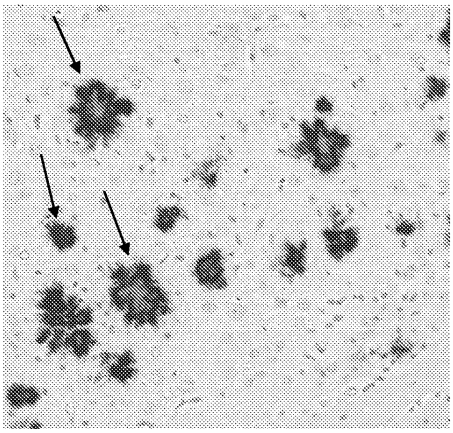
Фиг. 4C



Фиг. 5



Фиг. 6A



Фиг. 6В

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2