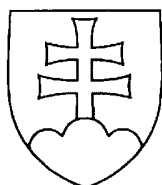


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **6. 12. 2001**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/251 892**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 12. 2000**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 3. 2004**  
Vestník ÚPV SR č.: **3/2004**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky  
v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **PCT/US01/46587**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **WO02/46237**

(11), (21) Číslo dokumentu:

**850-2003**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :

**C07K 16/18,  
A61P 25/28,  
A61K 39/395,  
C12N 15/13,  
C12N 15/85,  
C12N 5/10**

- (71) Prihlasovateľ: **NEURALAB LIMITED, Smiths, FL, BM;  
Wyeth, Madison, NJ, US;**  
(72) Pôvodca: **Basi Guriq, Palo Alto, CA, US;  
Saldanha Jose, Enfield, Middlesex, GB;  
Yednock Ted, Forest Knolls, CA, US;**  
(74) Zástupca: **ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Humanitné protilátky, ktoré spoznávajú beta amyloidový peptid**

- (57) Anotácia:  
Sú opísané látky a metódy na liečbu ochorení súvisiacich  
s amyloidovými A $\beta$  v mozgu pacienta. K výhodným lát-  
kam patria humanizované protilátky.

**SK 850-2003 A3**

## Humanizované protilátky, ktoré spoznajú beta amyloidový peptid

### Súvisice prihlášky

Táto prihláška si uplatňuje nároky na prínos už podanej dočasnej prihlášky patentu USA sériové č. 60/251,892 (podanej 6. decembra 2000) pod názvom „Humanizované protilátky, ktoré spoznajú beta amyloidový peptid“. Úplný obsah vyššie uvedenej prihlášky je tu uvedený ako odkaz.

### Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka látok a spôsobov liečenia ochorení súvisiacich s amyloidovými depozitmi A $\beta$  v mozgu pacienta.

### Doterajší stav techniky

Alzheimerova choroba (AD) je progresívna choroba, ktorá vyústi do senilnej demencie. Pozri všeobecne SELKOE, *TINS* 16:403 (1993); Hardy a kol., WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:438 (1994); Duff a kol., *Nature* 373:476 (1995); Games a kol., *Nature* 373:523 (1995). V podstate táto choroba spadá do dvoch kategórií: s oneskoreným nástupom, ktorá sa vyskytuje v staršom veku (65 rokov a viac), a so včasným nástupom, ktorá sa vyvinie podstatne skôr pred obdobím senility, t.j. vo veku medzi 35 a 60 rokov. U oboch typov ochorenia je patológia rovnaká, avšak abnormality bývajú ťažšie a rozsiahlejšie v prípadoch, ktoré začínajú v skoršom veku. Chorobu charakterizujú prinajmenšom dva typy lézií v mozgu, neurofibrilárne spletenice a senilné plaky. Neurofibrilárne spletenice sú intracelulárne ložiská mikrotubúl súvisiace s tau proteínom pozostávajúce z dvoch vlákien navzájom spletených v pároch. Senilné plaky (t.j. amyloidné plaky) sú oblasti neorganizovanej siete vlákien (neuropilu) do veľkosti v priemere až 150  $\mu$ m s extracelulárnymi ložiskami amyloidu v strede, ktoré sú viditeľné mikroskopickou analýzou rezov mozgové-

ho tkaniva. Akumulácia amyloidových plakov v mozgu sa tiež vyskytuje pri Downovom syndróme a pri iných kognitívnych poruchách.

Hlavnou zložkou plakov je peptid označovaný ako A $\beta$  alebo  $\beta$ -amyloidový peptid. A $\beta$  peptid je 4 kDa interný fragment aminokyselín 39-43 väčšieho transmembránového glykoproteínu pomenovaného proteín s názvom amyloidový prekurzorový proteín (APP). Ako dôsledok proteolytického pôsobenia rozličných enzýmov sekretázy na APP sa A $\beta$  spočiatku nachádza v krátkej forme, s dĺžkou 40 aminokyselín, a v dlhej forme s dĺžkou v rozsahu 42-43 aminokyselín. Časť hydrofóbnej transmembránovej domény APP sa nachádza na karboxylovom konci A $\beta$  a môže vysvetľovať schopnosť A $\beta$  zhľukovať sa do plakov, najmä v prípade dlhej formy. Akumulácia amyloidových plakov v mozgu nakoniec vedie k smrti nervových buniek. Fyzické symptómy spojené s týmto typom nervovej degenerácie charakterizujú Alzheimerovu chorobu.

Niektoré mutácie v APP proteíne sa dávali do súvisu s prítomnosťou Alzheimerovej choroby. Pozri napr. Goate a kol., *Nature* 349:704 (1991) (valín<sup>717</sup> za izoleucín); Chartier Harlan a kol., *Nature* 353:844 (1991) (valín<sup>717</sup> za glycín); Murrell a kol., *Science* 254:97 (1991) (valín<sup>717</sup> za fenylalanín); Mullan a kol., *Nature Genet.* 1:345 (1992) (dvojitá mutácia meniaca lyzín<sup>595</sup>-metionín<sup>596</sup> za asparagín<sup>595</sup>-leucín<sup>596</sup>). Predpokladá sa, že takéto mutácie spôsobujú Alzheimerovu chorobu zvýšením alebo zmenou premeny APP na A $\beta$ , najmä premenou APP na vyššie množstvá dlhej formy A $\beta$  (t.j. A $\beta$ -42 a A $\beta$ -43). Predpokladá sa, že mutácie v iných génoch, ako sú presenilínové gény, PS1 a PS2, nepriamo ovplyvňujú premenu APP tak, že sa zvyšujú množstvá dlhej formy A $\beta$  (pozri Hardy, *TINS* 20:154 (1997)).

Na určenie významu amyloidných plakov pri Alzheimerovej chorobe sa úspešne použili myšie modely (Games a kol., pozri vyššie, Johnson-Wood a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550 (1997)). Najmä v prípade, keď sa PDAPP transgenickým myšiam (ktoré exprimujú mutantnú formu ľudského APP a vyvinie sa u nich Alzheimerova choroba v mladom veku) vstrekuje dlhá forma A $\beta$ , prejavujú spomalenie progresie Alzheimeru a zvyšujú titre protilátok na A $\beta$  peptid (Schenk a kol., *Nature* 400, 173 (1999)). Vyššie diskutované pozorova-

nia naznačujú, že A $\beta$ , najmä v jeho dlhej forme, je príčinným faktorom Alzheimerovej choroby.

McMichael v EP 526,511 navrhuje podávanie homeopatických dávok (menších než alebo rovných  $10^{-2}$  mg/deň) A $\beta$  pacientom so stanovenou diagnózou AD. U bežného človeka s asi 5 litrami plazmy sa očakáva, že dokonca aj horný limit tejto dávky vytvorí koncentráciu nie väčšiu než 2 pg/ml. Normálna koncentrácia A $\beta$  v ľudskej plazme je bežne v rozsahu 50-200 pg/ml (Seubert a kol., *Nature* 359:325 (1992)). Pretože dávka navrhnutá v EP 526,511 by sotva zmenila hladinu endogénne cirkulujúceho A $\beta$  a pretože EP 526,511 neodporúča použiť adjuvant ako imunostimulant, zdá sa nepravdepodobným, že by to malo nejaký terapeutický účinok.

Existuje preto potreba nových terapií a činidiel na liečenie Alzheimerovej choroby, najmä terapií a činidiel, ktoré môžu mať terapeutický účinok vo fyziologických (napr. netoxických) dávkach.

#### Podstata vynálezu

Tento vynález predstavuje nové imunologické činidlá, najmä terapeutické protilátkové činidlá na prevenciu a liečbu amyloidogénnej choroby (napr. Alzheimerovej choroby). Vynález vychádza aspoň sčasti z identifikácie a charakterizácie dvoch monoklonálnych protilátok, ktoré sa špecificky viažu na A $\beta$  peptid a sú účinné pri znížení množstva plakov a/alebo pri zmiernení neuritickej dystrofie spojennej s amyloidogénnymi poruchami. Štruktúrna a funkčná analýza týchto protilátok vedie k návrhu rozličných humanizovaných protilátok na profylaktické a/alebo terapeutické použitie. Vynález predstavuje najmä humanizáciu variabilných oblastí týchto protilátok, a preto poskytuje humanizovaný imunoglobulín alebo reťazce protilátok, neporušené humanizované imunoglobulíny alebo protilátky a funkčný imunoglobulín alebo fragmenty protilátok, najmä fragmenty viažuce antigén, opisovaných protilátok.

Opisujú sa tiež polypeptidy obsahujúce komplementaritu určujúce oblasti opisovaných monoklonálnych protilátok, ako sú polynukleotidové činidlá, vektory a hostitelia vhodní na zakódovanie uvedených polypeptidov.

Opisujú sa metódy liečby amyloidogénnych ochorení alebo porúch (napr. Alzheimerovej choroby), ako sú farmaceutické prípravky a sady na použitie v takýchto aplikáciách.

Vynález tiež predstavuje metódy identifikácie zvyškov v opisovaných monoklonálnych protilátkach, ktoré sú dôležité pre vhodnú imunologickú funkciu, a na identifikáciu zvyškov, ktoré sú vhodné na substitúciu pri konštrukcii humanizovaných protilátok majúcich zlepšenú schopnosť väzby a/alebo zníženú imunogénnosť, keď sa používajú ako terapeutické činidlá.

#### Stručný opis obrázkov

*Obrázok 1* zobrazuje usporiadanie sekvencií aminokyselín ľahkého reťazca myšej 3D6 protilátky, humanizovanej 3D6 protilátky, protilátky Kabat ID 109230 a protilátky zárodočnej línie A19. Oblasti CDR sú označené šípkami. Polotučnou kurzívou sú označené zriedkavé myšie zvyšky. Polotučne sú vyznačené pakovacie zvyšky (VH+VL). Výplň označuje kánonické/CDR interagujúce zvyšky. Hviezdičky označujú zvyšky vybraté na spätnú mutáciu v humanizovanom 3D6, verzia 1.

*Obrázok 2* zobrazuje usporiadanie sekvencií aminokyselín ťažkého reťazca myšej protilátky 3D6, humanizovanej protilátky 3D6, protilátky Kabat ID 045919 a protilátky zárodočnej línie VH3-23. Anotácia je rovnaká ako pre obrázok 1.

*Obrázok 3* graficky znázorňuje A $\beta$  väzbové vlastnosti 3D6, chimérického 3D6 a 10D5. *Obrázok 3A* je graf zobrazujúci väzbu A $\beta$  na chimérický 3D6 (PK1614) na porovnanie s myším 3D6. *Obrázok 3B* je graf znázorňujúci kompetíciu biotinylovaného 3D6 voči neoznačenému 3D6, PK1614 a 10D5 pri väzbe na A $\beta$ .

*Obrázok 4* znázorňuje homológny model 3D6 VH a VL, pričom ukazuje  $\alpha$ -uhlíkovú kosťru. VH sa zobrazuje ako bodkovaná čiara a VL ako plná čiara. Oblasti CDR sú vyznačené formou pásyky.

*Obrázok 5* graficky znázorňuje A $\beta$  väzbové vlastnosti chimérického 3D6 a humanizovaného 3D6. *Obrázok 5A* zobrazuje výsledky ELISA stanovujúce väzbu humanizovaného 3D6v1 a chimérického 3D6 na agregovaný A $\beta$ . *Obrázok 5B* zobrazuje výsledky ELISA stanovujúce väzbu humanizovaného 3D6v1 a humanizovaného 3D6v2 na agregovaný A $\beta$ .

*Obrázok 6* je graf kvantifikujúci väzbu humanizovaného 3D6 a chimérického 3D6 na A $\beta$  plaky z mozgových rezov PDAPP myší.

*Obrázok 7* je graf ukazujúci výsledky kompetičnej väzbovej skúšky zisťujúcej schopnosť humanizovaného 3D6 verzie 1 a 2, chimérického 3D6, myšieho 3D6 a 10D5 konkurovať myšiemu 3D6 pri väzbe na A $\beta$ .

*Obrázok 8* graficky znázorňuje *ex vivo* fagocytóznú skúšku zisťujúcu schopnosť humanizovaného 3D6v2, chimérického 3D6 a ľudského IgG sprostredkovať pohlcovanie A $\beta$  mikrogliálnymi bunkami.

*Obrázok 9* znázorňuje usporiadanie sekvencií aminokyselín 10D5 VL a 3D6 VL. Polotučne sú vyznačené zvyšky, ktoré sa presne zhodujú s 10D5.

*Obrázok 10* znázorňuje usporiadanie sekvencií aminokyselín 10D5 VH a 3D6 VH. Polotučne sú vyznačené zvyšky, ktoré sa presne zhodujú s 10D5.

#### Podrobný opis vynálezu

Tento vynález sa predstavuje nové imunologické činidlá a metódy prevencie a liečby Alzheimerovej choroby alebo iných amyloidogénnych ochorení. Vynález je založený aspoň sčasti na charakterizácii dvoch monoklonálnych imunoglobulínov, 3D6 a 10D5, účinných pri väzbe beta amyloidového proteínu (A $\beta$ ) (napr. väzbe rozpustného a/alebo agregovaného A $\beta$ ), sprostredkovaní fagocytózy (napr. agregovaného A $\beta$ ), znížení množstva plakov a/alebo pri zmier-

není neuritickéj dystrofie (napr. u pacienta). Vynález je ďalej založený na určení a štruktúrálnej charakterizácii primárnej a sekundárnej štruktúry variabilných ľahkých a ťažkých reťazcov týchto imunoglobulínov a identifikácii zvyškov dôležitých pre aktivitu a imunogénnosť.

Predstavujú sa tu imunoglobulíny, ktoré obsahujú variabilný ľahký a/alebo variabilný ťažký reťazec tu opísaných výhodných monoklonálnych imunoglobulínov. Predstavujú sa tu výhodné imunoglobulíny, napr. terapeutické imunoglobulíny, ktoré obsahujú humanizovaný variabilný ľahký a/alebo humanizovaný variabilný ťažký reťazec. Výhodné variabilné ľahké a/alebo variabilné ťažké reťazce obsahujú komplementaritu určujúcu oblasť (CDR) z monoklonálneho imunoglobulínu (napr. donorný imunoglobulín) a variabilné rámcové oblasti v zásade z ľudského akceptorného imunoglobulínu. Výraz „v zásade z ľudského akceptorného imunoglobulínu“ znamená, že väčšina zvyškov alebo kľúčové zvyšky rámcovej oblasti sú z ľudskej akceptornej sekvencie, ktorá však umožňuje substitúciu zvyškov v určitých polohách zvolených tak, aby sa zlepšila aktivita humanizovaného imunoglobulínu (napr. zlepšila aktivita tak, že lepšie napodobňuje aktivitu donorného imunoglobulínu), alebo zvolených tak, aby znižovali imunogénnosť humanizovaného imunoglobulínu.

V jednom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 3D6 variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) (t.j. obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:2 alebo obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:4) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je spätne zmutovaný na zodpovedajúci myši zvyšok, pričom uvedené spätná mutácia v zásade neovplyvňuje schopnosť reťazca smerovať väzbu A $\beta$ .

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 3D6 variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) (t.j. obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID

NO:2 a/alebo obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:4) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého alebo ťažkého reťazca, pričom zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny pozostávajúcej (a) zo zvyšku, ktorý nekovalentne viaže priamo antigén; (b) zo zvyšku susediaceho s CDR; (c) z CDR-interagujúceho zvyšku (napr. identifikovaného modelovaním ľahkého alebo ťažkého reťazca na vyriešenej štruktúre homológneho známeho imunoglobulínového reťazca); a (d) zo zvyšku nachádzajúceho sa na rozhraní VL-VH.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 3D6 variabilnú oblasť CDR a variabilné rámcové oblasti zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého alebo ťažkého reťazca, pričom zvyšok rámcovej oblasti je zvyškom schopným ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ľahkého reťazca, ktorá sa identifikuje analýzou trojrozmerného modelu variabilnej oblasti, napríklad zvyškom schopným interakcie s antigénom, zvyškom blízkym k väzbovému miestu antigénu, zvyškom spôsobilým interakcie s CDR, zvyškom susediacim s CDR, zvyškom do vzdialenosti 6 Å od CDR zvyšku, kánonickým zvyškom, zvyškom vernierovej zóny, medzireťazcovým zvyškom, neobvyklým zvyškom alebo zvyškom glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje CDR 3D6 variabilnej oblasti (napr. z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:2) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti vybratý zo skupiny pozostávajúcej z L1, L2, L36 a L46 (Kabatovo číslovanie) je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie



variabilnej oblasti ľahkého reťazca. V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje CDR 3D6 variabilnej oblasti (napr. z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:4) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti vybraný zo skupiny pozostávajúcej z H49, H93 a H94 (Kabatovo číslovanie) je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca.

Výhodné ľahké reťazce obsahujú rámcové oblasti typu II (Kabatova konvencia), napríklad rámcové oblasti z akceptorného imunoglobulínu Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 a Kabat ID U41645. Výhodné ťažké reťazce obsahujú rámcové oblasti typu III (Kabatova konvencia), napríklad rámcové oblasti z akceptorného imunoglobulínu Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 a Kabat ID M23691.

V jednom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 10D5 variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) (t.j. obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:14 alebo obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:16) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je spätne zmutovaný na zodpovedajúci myšiu zvyšok, pričom uvedené spätná mutácia v zásade neovplyvňuje schopnosť reťazca smerovať väzbu Aβ.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 10D5 variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) (t.j. obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:14 a/alebo obsahuje jednu, dve alebo tri CDR zo sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:16) a obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského ak-

ceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého alebo ťažkého reťazca, pričom zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny pozostávajúcej (a) zo zvyšku, ktorý nekovalentne viaže priamo antigén; (b) zo zvyšku susediaceho s CDR; (c) z CDR-interagujúceho zvyšku (napr. identifikovaného modelovaním ľahkého alebo ťažkého reťazca na vyriešenej štruktúre homológneho známeho imunoglobulínového reťazca); a (d) zo zvyšku nachádzajúceho sa na rozhraní VL-VH.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález ľahký alebo ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu, ktorý obsahuje 10D5 variabilnú oblasť CDR a variabilné rámcové oblasti zo sekvencie ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého alebo ťažkého reťazca, pričom zvyšok rámcovej oblasti je zvyškom schopným ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ľahkého reťazca, ktorá sa identifikuje analýzou trojrozmerného modelu variabilnej oblasti, napríklad zvyškom schopným interakcie s antigénom, zvyškom blízkym k väzbovému miestu antigénu, zvyškom spôsobilým interakcie s CDR, zvyškom susediacim s CDR, zvyškom do vzdialenosti 6 Å od CDR zvyšku, kánonickým zvyškom, zvyškom vernierovej zóny, medzireťazcovým zvyškom, neobvyklým zvyškom alebo zvyškom glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.

V inom praktickom uskutočnení vynález predstavuje, okrem vyššie opísaných substitúcií, substitúciu aspoň jedného zriedkavého zvyšku ľudskej rámcovej oblasti. Zriedkavý zvyšok sa môže napríklad substituovať aminokyselinovým zvyškom, ktorý je obvyklý pre ľudské sekvencie variabilného reťazca v tejto polohe. Zriedkavý zvyšok sa môže tiež substituovať zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z homológnej zárodočnej sekvencie variabilného reťazca (napr. zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti ľahkého reťazca sa môže substituovať zodpovedajúcim zárodočným zvyškom z A1, A17, A18, A2 alebo A19 zárodočnej imunoglobulínovej sekvencie alebo sa môže zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti ťažkého reťazca substituovať zodpovedajúcim zárodočným zvyš-

kom z VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 alebo VH3-11 zárodočnej imunoglobulínovej sekvencie.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález humanizovaný imunoglobulín, ktorý obsahuje ľahký reťazec a ťažký reťazec, ako je opísané vyššie, alebo fragment viažuci antigén uvedeného imunoglobulínu. Vo vzorovom praktickom uskutočnení sa humanizovaný imunoglobulín viaže (napr. špecificky viaže) na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$  alebo  $10^9 M^{-1}$ . V inom praktickom uskutočnení imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén obsahuje ťažký reťazec s izotypom  $\gamma 1$ . V inom praktickom uskutočnení imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén sa viaže (napr. špecificky viaže) na rozpustný beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) a agregovaný  $A\beta$ . V inom praktickom uskutočnení imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén sprostredkuje fagocytózu (napr. indukuje fagocytózu) beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ). V ešte ďalšom praktickom uskutočnení imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén prechádza u pacienta cez hematoencefalitickú bariéru. V ešte ďalšom praktickom uskutočnení znižuje imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén tvorbu beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ) a neuritickú dystrofiu u pacienta.

V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález chimérické imunoglobulíny, ktoré obsahujú 3D6 variabilné oblasti (napr. sekvencie variabilných oblastí uvedených ako SEQ ID NO:2 alebo SEQ ID NO:4). V ešte ďalšom praktickom uskutočnení predstavuje vynález imunoglobulín alebo jeho fragment viažuci antigén, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako SEQ ID NO:8 a variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako SEQ ID NO:5. V ešte ďalšom praktickom uskutočnení predstavuje vynález imunoglobulín alebo jeho fragment viažuci antigén, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako SEQ ID NO:12 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako SEQ ID NO:11. V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález chimérické imunoglobulíny, ktoré obsahujú 10D5 variabilné oblasti (napr. sekvencie variabilnej oblasti uvedené ako SEQ ID NO:14 alebo SEQ ID NO:16). V ešte inom praktickom uskutočnení imunoglobulín alebo jeho fragment viažuci antigén ďalej obsahuje konštantné oblasti z IgG1.

Tu opísané imunoglobulíny sú predovšetkým vhodné na použitie v liečebných metódach zameraných na prevenciu a liečbu amyloidogénnych ochorení. V jednom praktickom uskutočnení predstavuje vynález spôsob prevencie a liečby amyloidogénneho ochorenia (napr. Alzheimerovej choroby), ktorý zahŕňa podanie účinnej dávky humanizovaného imunoglobulínu pacientovi tu opísaným spôsobom. V inom praktickom uskutočnení predstavuje vynález farmaceutické prípravky, ktoré obsahujú tu opísaný humanizovaný imunoglobulín a farmaceutický nosič. Tiež sa tu opisujú izolované molekuly nukleových kyselín, vektory a hostiteľské bunky na prípravu imunoglobulínov alebo tu opísaných imunoglobulínových fragmentov alebo reťazcov, ako aj metódy na prípravu uvedených imunoglobulínov, imunoglobulínových fragmentov alebo imunoglobulínových reťazcov.

Tento vynález ďalej predstavuje spôsob identifikácie zvyškov 3D6 a 10D5 vhodných na substitúciu pri príprave humanizovaného 3D6, resp. 10D5 imunoglobulínu. Napríklad spôsob identifikácie zvyškov variabilnej rámcovej oblasti vhodnej na substitúciu zahŕňa modelovanie trojrozmernej štruktúry variabilnej oblasti 3D6 a 10D5 na vyriešenej štruktúre homológneho imunoglobulínu a analýzu uvedeného modelu na zvyšky schopné ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu 3D6 a 10D5 variabilných oblastí imunoglobulínu tak, že sa identifikujú zvyšky vhodné na substitúciu. Vynález ďalej predstavuje použitie sekvencie variabilnej oblasti uvedenej ako SEQ ID NO:2 alebo SEQ ID NO:4 alebo jej nejakej časti v príprave trojrozmerného obrazu 3D6 imunoglobulínu, 3D6 imunoglobulínového reťazca alebo jeho domény. Vynález tiež predstavuje použitie sekvencie variabilnej oblasti uvedenej ako SEQ ID NO:14 alebo SEQ ID NO:16 alebo jej nejakej časti v príprave trojrozmerného obrazu 10D5 imunoglobulínu, 10D5 imunoglobulínového reťazca alebo jeho domény.

Pred opisom tohto vynálezu môže byť na jeho pochopenie užitočné uviesť definície určitých výrazov, ktoré sa budú v ďalšom používať.

Výraz „imunoglobulín“ alebo „protilátka“ (ktoré sa tu používajú zameniteľne) označuje proteín viažuci antigén, ktorý má základnú štvorpolypeptidovú reťazcovú štruktúru pozostávajúcu z dvoch ťažkých a z dvoch ľahkých reťazcov, pričom uvedené reťazce sú stabilizované napríklad medzireťazcovými

disulfidickými väzbami, ktorý má schopnosť špecificky viazať antigén. Ťažké aj ľahké reťazce sú poskladané do domén. Výraz „doména“ označuje globulárnu oblasť ťažkého alebo ľahkého reťazca polypeptidu obsahujúcu peptidové slučky (napr. obsahujúcu 3 až 4 peptidové slučky) stabilizované napríklad ako  $\beta$ -skladaný list alebo medzireťazcovou disulfidickou väzbou. Domény sú ďalej označované ako „konštantné“ a „variabilné“, čo je založené na relatívne malej premenlivosti sekvencií v doménach rozličných prvkov triedy v prípade „konštantnej“ domény, alebo významnej premenlivosti v doménach rozličných prvkov triedy v prípade „variabilnej“ domény. „Konštantné“ domény na ľahkom reťazci sa označujú zameniteľne ako „konštantné oblasti ľahkého reťazca“, „konštantné domény ľahkého reťazca“, „CL“ oblasti alebo „CL“ domény. „Konštantné“ domény na ťažkom reťazci sa označujú zameniteľne ako „konštantné oblasti ťažkého reťazca“, „konštantné domény ťažkého reťazca“, „CH“ oblasti alebo „CH“ domény. „Variabilné“ oblasti na ľahkom reťazci sa označujú zameniteľne ako „variabilné oblasti ľahkého reťazca“, „variabilné domény ľahkého reťazca“, „VL“ oblasti alebo „VL“ domény. „Variabilné“ oblasti na ťažkom reťazci sa označujú zameniteľne ako „variabilné oblasti ťažkého reťazca“, „variabilné domény ťažkého reťazca“, „CH“ oblasti alebo „CH“ domény.

Výraz „oblasť“ označuje časť alebo diel reťazca protilátky a obsahuje tu definované konštantné a variabilné domény, ako aj samostatné diely a časti uvedených domén. Napríklad variabilné domény alebo oblasti ľahkého reťazca obsahujú „komplementaritu určujúce oblasti“ alebo „CDR“ povkladané medzi tu definovanými „rámcovými oblasťami“ alebo „FR“.

Imunoglobulíny alebo protilátky môžu existovať v monomérnej alebo v polymérnej forme. Výraz „fragment viažuci antigén“ označuje polypeptidový fragment imunoglobulínu alebo protilátky, ktorý viaže antigén alebo konkuruje intaktnej protilátke (t.j. intaktnej protilátke, z ktorej boli odvodené) pri väzbe antigénu (t.j. špecifickej väzbe). Výraz „konformácia“ označuje terciárnu štruktúru proteínu alebo polypeptidu (napr. protilátky, protilátkového reťazca, jej domény alebo oblasti). Napríklad spojenie „konformácia ľahkého (alebo ťažkého) reťazca“ označuje terciárnu štruktúru variabilnej oblasti ľahkého (alebo ťažkého) reťazca a spojenie „konformácia protilátky“ alebo „konformácia

fragmentu protilátky“ označuje terciárnu štruktúru protilátky alebo jej fragmentu.

„Špecifická väzba“ protilátky znamená, že protilátka prejavuje zjavnú afinitu k antigénu alebo preferovanému epitopu a výhodne neprejavuje významnú krížovú reaktivitu. „Zjavná“ alebo preferovaná väzba je väzba s afinitou aspoň  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$   $M^{-1}$  alebo  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Afinity väčšie ako  $10^7$   $M^{-1}$ , výhodne väčšie ako  $10^8$   $M^{-1}$ , sú výhodnejšie. Hodnoty medzi týmito hodnotami tiež patria do oblasti tohto vynálezu a výhodná väzbová afinita sa môže vyjadriť ako rozsah afínít, napríklad  $10^6$  až  $10^{10}$   $M^{-1}$ , výhodne  $10^7$  až  $10^{10}$   $M^{-1}$ , výhodnejšie  $10^8$  až  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Protilátka, ktorá „neprejavuje významnú krížovú reaktivitu“ je taká, ktorá sa nebude zjavne viazať na nežiaducu entitu (napr. na nežiaducu bielkovinnú entitu). Napríklad protilátka, ktorá sa špecificky viaže na A $\beta$ , sa bude zjavne viazať na A $\beta$ , ale nebude významne reagovať s ne-A $\beta$  proteínmi alebo peptidmi (napr. s ne-A $\beta$  proteínmi alebo peptidmi nachádzajúcimi sa v plakoch). Protilátka špecifická na preferovaný epitop nebude napríklad krížovo reagovať so vzdialenými epitopmi na rovnakom proteíne alebo peptide. Špecifická väzba sa môže stanoviť akýmkoľvek spôsobom uznávaným odborníkmi v problematike na stanovenie takejto väzby. Špecifická väzba sa výhodne stanovuje Scatchardovou analýzou a/alebo kompetičnými väzbovými skúškami.

Väzbové fragmenty sa pripravujú rekombinantnými DNA technikami alebo enzymatickým alebo chemickým štiepením intaktných imunoglobulínov. Väzbové fragmenty zahŕňajú Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Fv, jednoduché reťazce a protilátky s jednoduchým reťazcom. Pod iným ako „bišpecifickým“ alebo „bifunkčným“ imunoglobulínom alebo protilátkou sa rozumie imunoglobulín alebo protilátka, ktorá má všetky jej väzbové miesta identické. „Bišpecifická“ alebo „bifunkčná protilátka“ je umelá hybridná protilátka, ktorá má dva rozličné páry ťažkého/lahkého reťazca a dve rozličné väzbové miesta. Bišpecifické protilátky sa môžu pripraviť rôznymi metódami zahŕňajúcimi fúziu hybridómov alebo prepojenie Fab' fragmentov. Pozri napr. Songsivilai a Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny a kol. *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Výraz „humanizovaný imunoglobulín“ alebo „humanizovaná protilátka“ označuje imunoglobulín alebo protilátku, ktorá obsahuje aspoň jeden reťazec imunoglobulínu alebo protilátky (t.j. aspoň jeden humanizovaný ľahký alebo ťažký reťazec). Výraz „humanizovaný reťazec imunoglobulínu“ alebo „humanizovaný reťazec protilátky“ (t.j. „ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu“ alebo „ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu“) označujú reťazec imunoglobulínu alebo protilátky (t.j. ľahký resp. ťažký reťazec), ktorá má variabilnú oblasť, ktorá obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade z ľudského imunoglobulínu alebo protilátky a komplementaritu určujúce oblasti (CDR) (napr. aspoň jednu CDR, výhodne dve CDR, výhodnejšie tri CDR) v zásade z nečlovečieho imunoglobulínu alebo protilátky, a ďalej obsahuje konštantné oblasti (napr. aspoň jednu konštantnú oblasť alebo jej časť v prípade ľahkého reťazca, a výhodne tri konštantné oblasti v prípade ťažkého reťazca). Výraz „humanizovaná variabilná oblasť“ (napr. „humanizovaná variabilná oblasť ľahkého reťazca“ alebo „humanizovaná variabilná oblasť ťažkého reťazca“) označuje variabilnú oblasť, ktorá obsahuje variabilnú rámcovú oblasť v zásade z ľudského imunoglobulínu alebo protilátky a komplementaritu určujúce oblasti (CDR) v zásade z nečlovečieho imunoglobulínu alebo protilátky.

Spojenie „v zásade z ľudského imunoglobulínu alebo protilátky“ alebo „v zásade ľudský“ znamená, že keď sa sekvencia zorientuje na porovnanie s amino sekvenciou ľudského imunoglobulínu alebo protilátky, táto oblasť vykazuje aspoň 80 - 90%, výhodne 90 - 95%, výhodnejšie 95 - 99% identitu (t.j. lokálnu identitu sekvencie) so sekvenciou ľudskej rámcovej oblasti alebo konštantnej oblasti, čo dovoľuje napríklad konzervatívne substitúcie, substitúcie konsenzuálnej sekvencie, substitúcie zárodočnej línie, spätné mutácie a podobne. Zavedenie konzervatívnych substitúcií, substitúcií konsenzuálnych sekvencií, substitúcií zárodočných línií, spätných mutácií a podobne sa často označuje ako „optimalizácia“ humanizovanej protilátky alebo reťazca. Spojenie „v zásade z nečlovečieho imunoglobulínu alebo protilátky“ alebo „v zásade nečlovečieho“ znamená, že sekvencia imunoglobulínu alebo protilátky je aspoň na 80 - 95 %, výhodne na 90 - 95 %, výhodnejšie na 96 %, 97 %, 98 % alebo 99 % identická zo sekvenciou nečlovečieho organizmu, napr. iného cicavca ako človeka.

Všetky oblasti alebo zvyšky humanizovaného imunoglobulínu alebo protilátky, alebo reťazca humanizovaného imunoglobulínu alebo protilátky, s možnou výnimkou CDR, sú teda v zásade identické s zodpovedajúcimi oblasťami alebo zvyškami jednej alebo viacerých natívnych ľudských imunoglobulínových sekvencií. Výraz „odpovedajúca oblasť“ alebo „odpovedajúci zvyšok“ označuje oblasť alebo zvyšok na druhej sekvencii aminokyselín alebo nukleotidov, ktorá obsadzuje rovnakú (t.j. ekvivalentnú) polohu ako oblasť alebo zvyšok na prvej sekvencii aminokyselín alebo nukleotidov, keď sa prvá a druhá sekvencia optimálne orientujú voči sebe na účely porovnania.

Výraz „humanizovaný imunoglobulín“ alebo „humanizovaná protilátka“ nie sú určené na to, aby zahŕňali chimérické imunoglobulíny alebo protilátky, ako sú definované nižšie. Hoci humanizované imunoglobulíny alebo protilátky sú chimérické svojou konštrukciou (t.j. obsahujú oblasti proteínu z viac ako jedného druhu), obsahujú dodatočné znaky (t.j. variabilné oblasti obsahujúce donorné CDR zvyšky a zvyšky akceptorných rámcových oblastí), ktoré sa nena-chádzajú v tu definovaných chimérických imunoglobulínoch alebo protilátkach.

Výraz „významná identita“ znamená, že dve sekvencie polypeptidov, keď sa optimálne porovnajú, ako napríklad programami GAP alebo BESTFIT pomocou bežných gap váh, vykazujú aspoň 50 - 60% identitu sekvencií, výhodne 60 - 70% identitu sekvencií, výhodnejšie 70 - 80% identitu sekvencií, výhodnejšie aspoň 80 - 90% identitu, ešte výhodnejšie aspoň 90 - 95% identitu a ešte výhodnejšie aspoň 95 % identitu sekvencií alebo viac (napr. 99 % identitu sekvencií alebo viac). Výraz „značná identita“ znamená, že dve sekvencie polypeptidov, keď sú optimálne porovnajú, ako napríklad programami GAP alebo BESTFIT pomocou bežných gap váh, vykazujú aspoň 80-90 % identitu sekvencií, výhodne 90-95 % identitu sekvencií a výhodnejšie aspoň 95 % identitu sekvencií alebo viac (napr. 99 % identitu sekvencií alebo viac). Pri porovnaní sekvencií vystupuje jedna sekvencia ako referenčná sekvencia, s ktorou sa skúšané sekvencie porovnávajú. Pri použití algoritmu porovnávania sekvencií sa skúšaná a referenčná sekvencia vložia do počítača, ak je treba, vytvoria sa súradnice podsekvencií a vytvoria sa parametre programu sekvenčného algoritmu. Algoritmus porovnania sekvencií potom vypočíta identitu sekvencií v persen-



tách pre skúšanú sekvenciu (sekvencie) voči referenčnej sekvencii založenú na vytvorených parametroch programu. Výrazy „významná identita sekvencií“ a „značná identita sekvencií“ sa tu používajú zameniteľne.

Optimálne zorientovanie sekvencií pre porovnanie sa môže vykonať napr. algoritmom lokálnej homológie od Smitha a Watermana, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), algoritmom na homológne zorientovanie od Needlemana a Wunscha, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), metódou hľadania podobnosti od Pearsona a Lipmana, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), počítačovými implementáciami týchto algoritmov (GAP, BESTFIT, FASTA a TFASTA vo Wisconsin Genetics Software Package, Genetic Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) alebo vizuálnym ohodnotením (pozri vo všeobecnosti Ausubel a kol., *Current Protocols in Molecular Biology*). Jedným z príkladom algoritmov, ktorý je vhodný na stanovenie percentuálnej identity sekvencií a podobnosti sekvencií, je algoritmus BLAST, ktorý je opísaný v Altschul a kol., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). Softvér na vykonanie BLAST analýz je verejne dostupný cez National Center for Biotechnology Information (Národné centrum pre biotechnologické informácie) (verejne dostupné cez internetový server NCBI Národného inštitútu zdravia). Na porovnanie sekvencií sa môžu spravidla použiť obvyklé parametre programu, aj keď je tiež možné použiť upravené parametre. Pre sekvencie aminokyselín používa BLAST program ako obvyklé parametre dĺžku slova (W) 3, očakávanie (expectation, E) 10 a bodovaciu maticu BLOSUM62 (pozri Henikoff a Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Polohy zvyškov, ktoré nie sú identické, sa výhodne líšia v konzervatívnych substitúciách aminokyselín. Na účely klasifikácie substitúcií aminokyselín ako konzervatívnych a nekonzervatívnych, sa aminokyseliny zaraďujú do skupín nasledujúcim spôsobom: skupina I (hydrofóbne bočné reťazce): leu, met, ala, val, leu, ile; skupina II (neutrálne hydrofilné bočné reťazce): cys, ser, thr; skupina III (kyslé bočné reťazce): asp, glu; skupina IV (zásadité bočné reťazce): asn, gln, his, lys, arg; skupina V (zvyšky ovplyvňujúce orientáciu reťazca): gly, pro; a skupina VI (aromatické bočné reťazce) trp, tyr, phe. Konzervatívne substitúcie zahŕňajú substitúcie medzi aminokyselinami z tej istej

triedy. Nekonzervatívne substitúcie znamenajú výmenu prvku jednej z týchto tried za prvok inej triedy.

Humanizované imunoglobulíny alebo protilátky viažu výhodne antigén s afinitou, ktorá je trikrát, štyrikrát alebo päťkrát vyššia ako afinita zodpovedajúcej nečlovečej protilátky. Keď má napríklad nečlovečia protilátka afinitu väzby  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , humanizované protilátky budú mať afinitu väzby aspoň  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,

$4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , alebo  $10^9 \text{ M}^{-1}$ . Pri opise väzbových vlastností reťazca imunoglobulínu alebo protilátky sa tento reťazec môže opísať na základe jeho schopnosti „smerovať väzbu antigénu“ (napr. A $\beta$ ). Hovorí sa, že reťazec „smeruje väzbu antigénu“, keď udeľuje intaktnému imunoglobulínu alebo protilátke (alebo jej fragmentu viažucemu antigén) špecifické väzbové vlastnosti alebo afinitu väzby. Hovorí sa, že mutácia (napr. spätná mutácia) podstatne ovplyvní schopnosť ťažkého alebo ľahkého reťazca smerovať väzbu antigénu, ak ovplyvní (napr. zníži) afinitu väzby intaktného imunoglobulínu alebo protilátky (alebo jej fragmentu viažuceho antigén), obsahujúcich uvedený reťazec, aspoň o jeden rád v porovnaní s protilátkou (alebo jej fragmentom viažucim antigén), ktorá obsahuje ekvivalentný reťazec bez uvedenej spätnej mutácie. Mutácia „podstatne neovplyvní (napr. nezníži) schopnosť reťazca smerovať väzbu antigénu“, ak ovplyvní (napr. zníži) afinitu väzby intaktného imunoglobulínu alebo protilátky (alebo jej fragmentu viažuceho antigén), obsahujúcich uvedený reťazec, len dvakrát, trikrát alebo štyrikrát v porovnaní s protilátkou (alebo jej fragmentom viažucim antigén) obsahujúcou ekvivalentný reťazec bez uvedenej spätnej mutácie.

Výraz „chimérický imunoglobulín“ alebo protilátka označuje imunoglobulín alebo protilátku, ktorých ľahké a ťažké reťazce sú odvodené z iných živočíšnych druhov. Chimérické imunoglobulíny alebo protilátky sa môžu vytvoriť napríklad genetickým inžinierstvom z imunoglobulínových génových segmentov patriacich iným živočíšnym druhom.

„Antigén“ je entita (napr. proteínová entita alebo peptid), na ktorý sa protilátky špecificky viaže.

Výraz „epitop“ alebo „antigénový determinant“ označuje miesto na antigéne, na ktoré sa imunoglobulín alebo protilátka (alebo jej fragment viažuci antigén) špecificky viaže. Epitopy môžu byť tvorené susediacimi aminokyselinami alebo nesusediacimi aminokyselinami privedenými do blízkosti terciárnou konformáciou proteínu. Epitopy tvorené susediacimi aminokyselinami sa spravidla zachovávajú pri pôsobení denaturujúcich rozpúšťadiel, kým epitopy tvorené terciárnou konformáciou sa spravidla stratia pri pôsobení denaturujúcim rozpúšťadlom. Epitopy spravidla obsahujú aspoň 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselín v unikátnej priestorovej konformácii. K metódam určenia priestorovej konformácie epitopov patrí napríklad röntgenová kryštalografia a dvojrozmerná jadrová magnetická rezonancia. Pozri napr. *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, zv. 66, red. G. E. Morris (1996).

Protilátky, ktoré spoznajú rovnaký epitop, sa môžu identifikovať jednoduchou imunologickou skúškou ukazujúcou schopnosť jednej protilátky blokovat' väzbu inej protilátky na terčový antigén, t.j. kompetičnou väzbovou skúškou. Kompetičná väzba sa stanovuje skúškou, pri ktorej skúšaný imunoglobulín inhibuje špecifickú väzbu referenčnej protilátky na bežný antigén, ako je A $\beta$ . Je známy rad druhov kompetičných väzbových skúšok, napríklad: priama alebo nepriama rádioimunologická skúška v tuhej fáze (RIA), priama alebo nepriama enzýmová imunologická skúška v tuhej fáze (EIA), sendvičová kompetičná skúška (pozri Stahli a kol., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); priama biotín-avidín EIA v tuhej fáze (pozri Kirkland a kol., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); priamo značkováaná skúška v tuhej fáze, priamo značkováaná sendvičová skúška v tuhej fáze (pozri Harlow a Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); priamo značkováaná RIA v tuhej fáze s použitím I-125 značkovania (pozri Morel a kol., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); priama biotín-avidín EIA v tuhej fáze (Cheung a kol., *Virology* 176:546 (1990)); a priamo značkováaná RIA (Moldenhauer a kol., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Takáto skúška obvykle zahŕňa použitie prečisteného antigénu naviazaného na pevný povrch alebo buniek nesúcich buď neoznačený skúšaný imunoglo-

bulín alebo označený referenčný imunoglobulín. Kompetičná inhibícia sa meria stanovením množstva označenej väzby k tuhému povrchu alebo na bunky v prítomnosti skúšaného imunoglobulínu. Skúšaný imunoglobulín je obvyčajne prítomný v prebytku. Keď je konkurenčná protilátka prítomná v prebytku, bude obvykle inhibovať špecifickú väzbu referenčnej protilátky k bežnému antigénu aspoň na 50 - 55 %, 55 - 60 %, 60 - 65 %, 65 - 70 %, 70 - 75 % alebo viac.

Epitop tiež spoznajú imunologické bunky, napríklad B bunky a/alebo T bunky. Bunkové spoznanie epitopu sa môže stanoviť skúškami *in vitro*, ktorými sa meria rozmnožovanie buniek závislom na antigéne, ako je pripojenie  $^3\text{H}$ -tymidínu, sekrécia cytokínov, sekrécia protilátok alebo usmrčovanie závislé na antigéne (cytotoxická T lymfocytová skúška).

Príklady epitopov alebo antigénových determinantov je možné nájsť v ľudskom amyloidovom prekursorovom proteíne (APP), ale výhodne sa nachádzajú v A $\beta$  peptide APP. Existuje viacero izoformiem APP, napríklad APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> a APP<sup>770</sup>. Aminokyselinám v APP sú priradené čísla podľa sekvencie APP<sup>770</sup> izoformy (pozri napr. GenBank prístupové číslo P05067, tiež uvedená ako SEQ ID NO:38). A $\beta$  peptid (označovaný tu tiež ako beta amyloidový peptid a A-beta peptid) je ~4-kDa interný fragment 39-43 aminokyselín APP (A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 A $\beta$ 43). Napríklad A $\beta$ 40 pozostáva zo zvyškov APP 672-711 a A $\beta$ 42 pozostáva zo zvyškov APP 673-713. Ako výsledok pôsobenia rozličných sekretázových enzýmov na APP *in vivo* alebo *in situ* sa A $\beta$  nachádza v „krátkej forme“ s dĺžkou 40 aminokyselín aj v „dlhej forme“ s dĺžkou v rozsahu 442-43 aminokyselín. Výhodné epitopy alebo antigénové determinanty, ako sú tu opísané, sú umiestnené na N-konci A $\beta$  peptidu a obsahujú zvyšky aminokyselín A $\beta$  1-10, výhodne zvyšky A $\beta$ 42 1-3, 1-4, 1-5, 1,6, 1-7, 3-7. Ďalšie spomínané epitopy alebo antigénové determinanty obsahujú zvyšky A $\beta$  2-4, 5, 6, 7 alebo 8, zvyšky A $\beta$  3-5, 6, 7, 8 alebo 9, alebo zvyšky A $\beta$ 42 4-7, 8, 9 alebo 10.

Výraz „amyloidogénne ochorenie“ zahŕňa ktorúkoľvek chorobu súvisiacu s (alebo spôsobenú) tvorbou alebo ukladaním nerozpustných amyloidných vlákien. K príkladom amyloidogénnych ochorení patria, ale neobmedzujú sa iba na ne, systemická amyloidóza, Alzheimerova choroba, diabetes dospelosti (2. ty-

pu), Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, fronto-temporálna demencia, a prenosné spongiformné encefalopatie spôsobené priónmi (kuru a Creutzfeldt-Jacobova choroba a ľudí, resp. scrapie a BSA u oviec a dobytky). Rozličné amyloidogénne ochorenia sú definované alebo charakterizované povahou ukladaných polypeptidových zložiek vlákien. Napríklad u subjektov alebo pacientov, ktorí majú Alzheimerovu chorobu, je charakteristickou polypeptidovou zložkou amyloidových depozitov  $\beta$ -amyloidový proteín (napr. nekultivovaný  $\beta$ -amyloidový proteín,  $\beta$ -amyloidový proteín iného typu alebo skrátený  $\beta$ -amyloidový proteín). Alzheimerova choroba je teda príkladom "ochorenia charakterizovaného depozitmi A $\beta$ " alebo „ochorenie súvisiace s depozitmi A $\beta$ “, napr. v mozgu subjektu alebo pacienta. Výrazy „ $\beta$ -amyloidový proteín“, „ $\beta$ -amyloidový peptid“, „ $\beta$ -amyloid“, „A $\beta$ “ a „A $\beta$  peptid“ sa tu používajú zameniteľne.

Výraz „účinná dávka“ alebo „účinné dávkovanie“ je definovaný ako množstvo dostačujúce na dosiahnutie alebo aspoň na čiastočné dosiahnutie požadovaného účinku. Výraz „terapeuticky účinné množstvo“ je definovaný ako množstvo dostačujúce na liečbu alebo aspoň na čiastočné zastavenie choroby a jej komplikácií u pacienta, ktorý už trpí chorobou. Množstvá účinné na dosiahnutie tohto cieľa budú závisieť od závažnosti infekcie a celkového stavu imunitného systému pacienta.

Výraz „pacient“ označuje človeka alebo iného cicavca, ktorí sa podrobujú buď profylaxii alebo liečbe.

„Rozpustný“ alebo „disociovaný“ A $\beta$  označuje A $\beta$  polypeptid, ktorý sa nezhlučuje alebo vznikol rozložením agregátov. „Nerozpustný“ A $\beta$  označuje A $\beta$  polypeptid tvoriaci agregáty, napríklad A $\beta$  držaný pohromade nekovalentnými väzbami. Predpokladá sa, že A $\beta$  (napr. A $\beta$ 42) tvorí agregáty, aspoň sčasti, kvôli prítomnosti hydrofóbných zvyškov na C-konci peptidu (časť transmembránovej domény APP). Jednou z metód prípravy rozpustného A $\beta$  je rozpustenie lyofilizovaného peptidu v čistom DMSO so sonifikáciou. Získaný roztok sa odstredí, aby sa odstránili akékoľvek nerozpustné častice.

## I. Imunologické a terapeutické činidlá

Imunologické a terapeutické činidlá tohto vynálezu, ako sú tu definované, zahŕňajú alebo pozostávajú z imunogénov a protilátok, ich funkčných alebo antigén viažucich fragmentov. Je známe, že základná štruktúrna jednotka protilátky obsahuje tetramér podjednotky. Každý tetramér je zložený z dvoch identických párov polypeptidových reťazcov, pričom každý pár má jeden „ľahký“ reťazec (asi 25 kDa) a jeden „ťažký“ reťazec (asi 50 - 70 kDa). Amino-koncová časť každého reťazca obsahuje variabilnú oblasť asi 100 až 110 alebo viac aminokyselín, ktoré sú primárne zodpovedné za spoznanie antigénu. Karboxy-koncová časť každého reťazca definuje konštantnú oblasť primárne zodpovednú za efektorovú funkciu.

Ľahké reťazce sú klasifikované buď ako kappa alebo lambda a majú dĺžku asi 230 zvyškov. Ťažké reťazce sú klasifikované ako gama ( $\gamma$ ), mí ( $\mu$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) alebo epsilon ( $\epsilon$ ) a majú dĺžku asi 450-600 zvyškov a definujú izotyp protilátky ako IgG, IgM, IgA, IgD, resp. IgE. Ťažké aj ľahké reťazce sú poskladané do domén. Výraz „doména“ označuje globulárnu oblasť proteínu, napríklad imunoglobulínu alebo protilátky. Domény imunoglobulínu alebo protilátky obsahujú napríklad 3 alebo štyri peptidové slučky stabilizované napríklad ako  $\beta$ -skladaná vrstva a medzireťazcovou disulfidickou väzbou. Intaktné ľahké reťazce majú napríklad dve domény ( $V_L$  a  $C_L$ ) a intaktné ťažké reťazce majú napríklad štyri alebo päť domén ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  a  $C_{H3}$ ).

V ľahkých a ťažkých reťazcoch sú variabilné a konštantné oblasti spojené „J“ oblasťou asi s 12 alebo viac aminokyselinami, pričom ťažký reťazec tiež obsahuje „D“ oblasť asi s 10 ďalšími aminokyselinami. (Pozri vo všeobecnosti *Fundamental Immunology* (red. W. Paul, 2. vyd., Raven Press, N.Y. (1989), kap. 7, ktorá je tu zaradená ako odkaz v jej celosti na všetky účely).

Variabilné oblasti každého ľahkého/ťažkého reťazca tvoria väzbové miesto protilátky. Intaktná protilátka má teda dve väzbové miesta. Okrem bifunkčných a bispecifických protilátok sú tieto dve väzbové miesta rovnaké. Reťazce majú vcelku rovnakú všeobecnú štruktúru relatívne konzervatívnych rámcových oblastí (FR) spojených tromi hypervariabilnými oblasťami, tiež nazý-

vanými komplementaritu určujúce oblasti alebo CDR. Prirodzene sa vyskytujúce reťazce alebo rekombinantne pripravené reťazce sa môžu exprimovať s leader sekvenciou, ktorá sa odstráni počas spracovania v bunke, čím sa získa dospelý reťazec. Dospelé reťazce sa môžu tiež pripravovať rekombinantne s nie prirodzene sa vyskytujúcou leader sekvenciou, napríklad na zvýšenie sekrécie alebo zmenu spracovania určitého zaujímavého reťazca.

CDR dvoch dospelých reťazcov každého páru sú orientované rámcovými oblasťami umožňujúcimi väzbu na špecifický epitop. Od N-konca k C-koncu ľahký aj ťažký reťazec obsahujú domény FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 a FR4. „FR4“ sa tiež označuje v odborných prácach ako D/J oblasť variabilného ťažkého reťazca a J oblasť variabilného ľahkého reťazca. Priradenie aminokyselín každej domény je v zhode s Kabatovou definíciou, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Národný inštitút zdravia, Bethesda, MD, 1987 a 1991). Inú štruktúrnu definíciu navrhli Chothia a kol., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); *Nature* 342:878 (1989); a *J. Mol. Biol.* 186:6561 (1989) (v ďalšom súhrnne označované ako „Chothia a kol.“ a sú tu zaradené ako odkaz v ich celosti na všetky účely).

### A. Aβ protilátky

Terapeutické činidlá tohto vynálezu zahŕňajú protilátky, ktoré sa špecificky viažu na Aβ alebo inú súčasť amyloidných plakov. Takéto protilátky môžu byť monoklonálne alebo polyklonálne. Niektoré takéto protilátky sa špecificky viažu na agregovanú formu Aβ bez väzby na rozpustnú formu. Niektoré sa špecificky viažu rozpustnú formu bez väzby na agregovanú formu. Niektoré sa viažu na agregovanú aj rozpustnú formu. Niektoré takéto protilátky sa viažu na prirodzene sa vyskytujúcu krátku formu Aβ (t.j. Aβ<sub>39</sub>, 40 alebo 41) bez väzby na prirodzene sa vyskytujúcu dlhú formu Aβ (t.j. Aβ<sub>42</sub> a Aβ<sub>43</sub>). Niektoré protilátky sa viažu na dlhú formu Aβ bez väzby na krátku formu. Niektoré protilátky sa viažu na Aβ bez väzby na amyloidový prekursorový proteín úplnej dĺžky. Protilátky používané v liečebných metódach majú výhodne intaktnú konštantnú oblasť alebo aspoň dostatočnú časť konštantnej oblasti, aby interago-

vala s Fc receptorom. Výhodný je ľudský izotyp IgG1, pretože má najvyššiu afinitu z ľudských izotypov na FcRI receptor na fagocytárnych bunkách. Môžu sa tiež použiť bišpecifické Fab fragmenty, v ktorých jedno rameno protilátky má špecificitu na A $\beta$  a druhé na Fc receptor. Výhodné protilátky sa viažu na A $\beta$  s väzbovou afinitou väčšou než (alebo rovnou) asi  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  alebo  $10^{10}$  M $^{-1}$  (zahrňujúc aj afinity medzi týmito hodnotami).

Polyklonálne séra obvykle obsahujú zmiešané populácie protilátok viažucich sa na niekoľko epitopov pozdĺž A $\beta$ . Polyklonálne séra však môžu byť špecifické na určitý segment A $\beta$ , ako je A $\beta$ 1-10. Monoklonálne protilátky sa viažu na špecifický epitop v A $\beta$ , ktorým môže byť konformačný alebo nekonformačný epitop. Profylaktická a terapeutická účinnosť protilátok sa môže skúšať pomocou transgenických zvieracích modelov opísaných v príkladoch. Výhodné monoklonálne protilátky sa viažu na epitop v rámci zvyškov 1-10 A $\beta$  (s prvým N-koncovým zvyškom prirodzeného A $\beta$  označeným 1). Niektoré výhodné monoklonálne protilátky sa viažu na epitop v rámci aminokyselín 1 - 5 a niektoré na epitop v rámci 5 - 10. Niektoré výhodné protilátky sa viažu na epitopy v rámci aminokyselín 1 - 3, 1 - 4, 1 - 5, 1 - 6, 1 - 7 alebo 3 - 7. Niektoré výhodné protilátky sa viažu na epitop začínajúc pri zvyškoch A $\beta$  1 - 3 a končiac pri zvyškoch A $\beta$  7 - 11. K menej výhodným protilátkam patria tie, ktoré sa viažu na epitop so zvyškami A $\beta$  10 - 15, 15 - 20, 25 - 30, 10 - 20, 20, 30 alebo 10 - 25. Odporúča sa, aby sa takéto protilátky pred použitím preverili z hľadiska aktivity na myších modeloch opísaných v príkladoch. Napríklad sa zistilo, že určité protilátky k epitopom v rámci zvyškov 10 - 18, 16 - 24, 18 - 21 a 33 - 42 majú nedostatok aktivity (napr. nedostatok aktivity pri znižovaní množstva plakov a/alebo pri zmiernení neuritickej patológie spojennej s Alzheimerovou chorobou). V niektorých metódach sa používa viacero monoklonálnych protilátok, ktoré majú špecifickú väzbovosť k rozličným epitopom. Takéto protilátky sa môžu podávať po sebe alebo súčasne. Môžu sa tiež použiť protilátky k amyloidovým zložkám iným ako A $\beta$  (napr. ako podávané alebo zároveň podávané). Protilátky sa napríklad môžu smerovať na proteín synukleín spojený s amyloidom.



Keď sa povie, že protilátka sa viaže na epitop v rámci špecifických zvyškov, ako sú napríklad A $\beta$  1 - 5, znamená to, že protilátky sa špecificky viažu na polypeptid obsahujúci tieto špecifikované zvyšky (t.j. v tomto prípade A $\beta$  1 - 5). Takáto protilátka sa nemusí nevyhnutne spojiť s každým zvyškom v rámci A $\beta$  1 - 5. Takisto každá jednotlivá substitúcia alebo delécia v A $\beta$  1 - 5 nevyhnutne významne neovplyvní väzbovú afinitu. Epitopová špecifita protilátky sa môže stanoviť napríklad vytvorením knižnice fágov, kde rozličné prvky ukazujú rozličné subsekvencie A $\beta$ . Potom sa vyberie knižnica fágov pre prvky špecificky sa viažuce na skúšanú protilátku. Vyčlení sa skupina sekvencií. Takáto skupina obvykle obsahuje spoločnú centrálnu sekvenciu a obklopujúce sekvencie premenlivej dĺžky u rozličných prvkov. Najkratšia centrálna sekvencia vykazujúca špecifickú väzbu k protilátke definuje epitop viazaný s protilátkou. Protilátky sa tiež môžu skúšať na epitopovú špecifitu v kompetičnej skúške s protilátkou, ktorej epitopová špecifita sa už stanovila. Napríklad protilátky, ktoré konkurujú 3D6 protilátke pri väzbe na A $\beta$ , sa viažu na rovnaký alebo podobný epitop ako 3D6, t.j. v rámci A $\beta$  zvyškov 1 - 5. Podobne protilátky, ktoré konkurujú protilátke 10D5, sa viažu na rovnaký alebo podobný epitop, t.j. v rámci A $\beta$  zvyškov 3 - 7. Vyčlenené protilátky pre epitopovú špecifitu sú užitočnou indíciou terapeutickej účinnosti. Napríklad protilátka, pre ktorú sa zistilo, že sa viaže na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1 - 7, bude pravdepodobne účinná v prevencii a liečbe Alzheimerovej choroby podľa metodológií tohto vynálezu.

Monoklonálne alebo polyklonálne protilátky, ktoré sa špecificky viažu na preferovaný segment A $\beta$  bez väzby na iné oblasti A $\beta$ , majú rad výhod v porovnaní s monoklonálnymi protilátkami viažucimi sa na iné oblasti alebo s polyklonálnymi sérami na intaktný A $\beta$ . Po prvé, pre dávky rovnakej hmotnosti obsahujú dávky protilátok, ktoré sa špecificky viažu na preferované segmenty, vyššie molárne dávky protilátok účinných v odstraňovaní amyloidových plakov. Po druhé, protilátky viažuce sa špecificky na preferovaný segment, môžu vyvolať odozvu odstraňovania amyloidových ložísk bez vyvolania odozvy odstraňovania intaktného APP polypeptidu, čím sa znížia možné vedľajšie účinky.

### I. Príprava nečlovečích protilátok

Tento vynález predstavuje nečlovečie protilátky, napríklad protilátky, ktoré majú špecificitu na preferované epitopy A $\beta$  podľa tohto vynálezu. Takéto protilátky sa môžu použiť pri výrobe rozličných terapeutických prípravkov tohto vynálezu alebo výhodne poskytujú komplementaritu určujúce oblasti na prípravu humanizovaných alebo chimérických protilátok (podrobne opísanú nižšie). Príprava nečlovečích monoklonálnych protilátok, napr. myší, morčiat, primátov, králikov alebo potkanov, sa môže napríklad uskutočniť imunizáciou zvierat s A $\beta$ . Môže sa tiež použiť dlhší polypeptid obsahujúci A $\beta$  alebo imunogénny fragment A $\beta$  alebo anti-idiotypové protilátky k protilátkam k A $\beta$ . Pozri Harlow a Lane vyššie, zaradené tu ako odkaz na všetky účely). Takýto imunogén sa môže získať z prírodných zdrojov, syntézou peptidu alebo rekombinantou expresiou. Imunogén sa prípadne môže podávať spojený alebo ináč komplexne viazaný s nosným proteínom, ako sa opisuje nižšie. Imunogén sa môže prípadne podávať s adjuvantom. Výraz „adjuvant“ označuje zlúčeninu, ktorá v prípade, že sa podáva v kombinácii s antigénom, zvyšuje imunitnú odozvu na antigén, avšak keď sa podáva samotná, nevyvolá imunitnú odozvu k antigénu. Adjuvant môže zvýšiť imunitnú odozvu niekoľkými mechanizmami, ku ktorým patrí mobilizácia lymfocytov, stimulácia B buniek a T buniek a stimulácia makrofágov. Môže sa použiť niekoľko typov adjuvantov, ako sa opisuje nižšie. Na imunizáciu laboratórnych zvierat je výhodný kompletný Freundov adjuvant nasledovaný nekompletným adjuvantom.

Na prípravu polyklonálnych protilátok sa obvykle používajú králiky alebo morčatá. Ukážková príprava polyklonálnych protilátok, napr. na pasívnu ochranu, sa môže uskutočniť nasledujúcim spôsobom. 125 netransgenických myší sa imunizuje 100 $\mu$ g A $\beta$ 1 - 42 a adjuvantom CFA/IFA a utratia sa vo veku 4 - 5 mesiacoch. Z imunizovaných myší sa odoberie krv. Protilátky špecifické pre imunogén sa môžu čiastočne prečistiť afinitnou chromatografiou. V priemere na jednu myš sa získa asi 0,5 - 1 mg protilátky špecifickej pre imunogén, čo poskytne celkove 60 - 120 mg.

Na prípravu monoklonálnych protilátok sa obvykle používajú myši. Monoklonálne protilátky sa môžu pripraviť proti fragmentu vstreknutím tohto

fragmentu alebo dlhšej formy A $\beta$  do myši, prípravou hybridómov a skríningom hybridómov na protilátku, ktorá špecificky viaže A $\beta$ . Protilátky sa prípadne vytriedia podľa väzby na špecifickú oblasť alebo požadovaný fragment A $\beta$  bez väzby na iné neprekrývajúce sa fragmenty A $\beta$ . Posledne menovaný skríning sa môže vykonať stanovením väzby protilátky na súbor delečných mutantov peptidu A $\beta$  a určením, ktoré delečné mutanty sa viažu na protilátku. Väzba sa môže zhodnotiť napríklad Western blot skúškou alebo metódou ELISA. Najmenší fragment, ktorý prejaví špecifickú väzbu na protilátku, definuje epitop protilátky. Špecifita epitopu sa môže prípadne stanoviť kompetičnou skúškou, v ktorej skúšaná a referenčná protilátka si konkurujú vo väzbe s A $\beta$ . Ak si skúšaná a referenčná protilátka konkurujú, potom sa môžu viazať na rovnaký epitop alebo na dostatočne blízke epitopy tak, že väzba jednej protilátky interferuje s väzbou inej. Výhodným izotypom pre takéto protilátky je myšší izotyp IgG2 alebo ekvivalentný izotyp iného živočíšneho druhu. Myšší izotyp IgG2 je ekvivalentom ľudského izotypu IgG1.

## 2. Chimérické alebo humanizované protilátky

Tento vynález tiež predstavuje chimérické a/alebo humanizované protilátky (t.j. chimérické a/alebo humanizované imunoglobulíny) špecifické pre beta amyloidový peptid. Chimérické a/alebo humanizované protilátky majú rovnakú alebo podobnú väzbovú špecifitu a afinitu ako myšia alebo iná nečlovečia protilátka, ktorá je východiskovým materiálom na skonštruovanie chimérickej alebo humanizovanej protilátky.

### A. Príprava chimérických protilátok

Výraz „chimérické protilátky“ označuje protilátku, ktorej gény ľahkého a ťažkého reťazca sa skonštruovali, obvykle genetickým inžinierstvom, zo segmentov génov imunoglobulínu patriacim rozličným živočíšnym druhom. Napríklad variabilné (V) segmenty génov z myšej monoklonálnej protilátky sa môžu pripojiť k ľudským konštantným (C) segmentom, ako sú IgG1 a IgG4. Výhodný

je ľudský izotyp IgG1. Obvyklou chimérickou protilátkou je teda hybridný proteín, ktorý pozostáva z V domény alebo domény viažucej antigén z myšej protilátky a z C domény alebo efektorovej domény ľudskej protilátky.

### B. Príprava humanizovaných protilátok

Výraz „humanizovaná protilátka“ označuje protilátku, ktorá obsahuje aspoň jeden reťazec obsahujúci zvyšky variabilnej rámcovej oblasti v zásade z reťazca ľudskej protilátky (označovanej ako akceptorný imunoglobulín alebo protilátka) a aspoň jednu komplementaritu určujúcu oblasť v zásade z myšej protilátky (označovanej ako donorný imunoglobulín alebo protilátka). Pozri Queen a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989), US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,762, Selick a kol., WO 90/07861 a Winter, US 5,225,539 (zaradené ako odkaz vo svojej celosti a na všetky účely). Konštantné oblasti, ak sú prítomné, sú tiež v zásade alebo úplne z ľudského imunoglobulínu.

Je najpravdepodobnejšie, že substitúcia CDR do rámcovej oblasti ľudskej variabilnej domény má za následok zachovanie jej správnej priestorovej orientácie, ak rámcová oblasť ľudskej variabilnej domény prijme rovnakú alebo podobnú konformáciu ako myšia variabilná rámcová oblasť, z ktorej CDR pochádzajú. Toto sa dosiahne získaním ľudských variabilných domén z ľudských protilátok, ktorých sekvencie rámcovej oblasti vykazujú vysoký stupeň identity sekvencií s doménami myšej variabilnej rámcovej oblasti, z ktorých sú CDR odvodené. Variabilné rámcové oblasti ťažkého a ľahkého reťazca sa môžu odvodíť z rovnakých alebo rozličných sekvencií ľudskej protilátky. Sekvencie ľudskej protilátky môžu byť sekvenciami prirodzene sa vyskytujúcich ľudských protilátok alebo to môžu byť konsenzuálne sekvencie niekoľkých ľudských protilátok. Pozri Kettleborough a kol., *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger a ko., *Protein Engineering* 6:971 (1993) a Carter a kol., WO 92/22653.

Keď sa identifikujú komplementaritu určujúce oblasti myšieho donorného imunoglobulínu a vhodné akceptorné imunoglobulíny, ďalším krokom je stanovenie, ktoré zvyšky z týchto zložiek, ak vôbec nejaké, by sa mali substituovať,

aby sa optimalizovali vlastnosti výslednej humanizovanej protilátky. Vo všeobecnosti by sa substitúcia ľudských aminokyselinových zvyškov myšími mala minimalizovať, pretože zavedenie myších zvyškov zvyšuje riziko, že protilátka vyvolá odozvu ľudskej-proti-myšej protilátky (HAMA) u ľudí. Na monitorovanie HAMA odozvy u určitého pacienta alebo počas klinických pokusov sa môžu použiť metódy stanovenia imunitnej odozvy, ktoré sú uznávané v tomto odbore. Pacienti, ktorí dostávajú humanizované protilátky, sa môžu vyhodnotiť z hľadiska imunogénnosti na začiatku a v priebehu poskytovania uvedenej liečby. HAMA odozva sa meria napríklad detekciou protilátok na humanizovanú terapeutickú látku vo vzorkách séra z pacientov pomocou metódy známej odborníkom v problematike, zahŕňajúcej technológiu povrchovej plazmonovej rezonancie (BIACORE) a/alebo analýzu ELISA v tuhej fáze.

Na substitúciu sa vyberú určité aminokyseliny zo zvyškov ľudských variabilných rámcových oblastí na základe ich možného vplyvu na konformáciu CDR a/alebo väzbu antigénu. Neprirodzená poloha myších CDR oblastí v susedstve ľudskej variabilnej rámcovej oblasti môže viesť k neprirodzeným konformačným obmedzeniam, ktoré v prípade, že nie sú korigované substitúciou určitých aminokyselinových zvyškov, vedú k strate väzbovej afinity.

Výber aminokyselinových zvyškov na substitúciu sa určí sčasti počítačovým modelovaním. Opisuje sa tu počítačový hardvér a softvér na vytvorenie trojrozmerných obrazov molekúl imunoglobulínu. Molekulárne modely sa vo všeobecnosti vytvárajú tak, že sa vychádza z vyriešených štruktúr imunoglobulínových reťazcov alebo ich domén. Porovná sa podobnosť sekvencie aminokyselín reťazcov, ktoré sa majú modelovať, s reťazcami alebo doménami vyriešených trojrozmerných štruktúr, a reťazce alebo domény, ktoré prejavujú najväčšiu podobnosť sekvencií, sú zvolené ako východiskové body pre konštrukciu molekulového modelu. Na modelovanie sa vyberú reťazce alebo domény, ktoré prejavujú aspoň 50% identitu sekvencie, a výhodnejšie sa na modelovanie vyberú tie, ktoré prejavujú aspoň 60%, 70%, 80%, 90% identitu sekvencie a väčšiu. Vyriešené východiskové štruktúry sa modifikujú tak, aby umožňovali odlišnosti medzi skutočnými aminokyselinami v reťazcoch alebo doménach modelovaného imunoglobulínu a tými, ktoré sú vo východiskovej štruktúre. Z

modifikovaných štruktúr sa potom poskladá kompozitný imunoglobulín. Nakoniec sa model vylepší minimalizáciou energie a overením, či všetky atómy sú vo vhodných vzdialenostiach od seba a či dĺžky väzieb a väzbové uhly sú v rámci chemicky akceptovateľných limitov.

Výber aminokyselinových zvyškov na substitúciu sa môže tiež sčasti určiť vyšetrením charakteristík aminokyselín v určitých polohách alebo empirickým pozorovaním účinkov substitúcie alebo mutagenézy určitých aminokyselín. Keď sa napríklad líši aminokyselina vo zvyšku myšej variabilnej rámcovej oblasti a zvyšku vybratej ľudskej variabilnej rámcovej oblasti, potom aminokyselina ľudskej rámcovej oblasti sa obyčajne musí substituovať ekvivalentnou aminokyselinou rámcovej oblasti z myšej protilátky, keď sa dôvodne očakáva, že aminokyselina:

- (1) nekovalentne viaže antigén priamo,
- (2) susedí s CDR oblasťou,
- (3) interaguje inak s CDR oblasťou (napr. je vo vzdialenosti asi 3-6 Å od CDR oblasti, ako sa určí počítačovým modelovaním) alebo
- (4) nachádza sa na rozhraní VL-VH.

Zvyšky, ktoré „nekovalentne viažu priamo antigén“, zahŕňajú aminokyseliny v polohách rámcových oblastí, ktoré majú vysokú pravdepodobnosť priamo interagovať s aminokyselinami na antigéne pomocou existujúcich chemických síl, napríklad vodíkovej väzby, Van der Waalsových síl, hydrofóbných interakcií a podobne.

CDR a rámcové oblasti sú definované podľa Kabat a kol. alebo Chothia a kol., pozri vyššie. Keď zvyšky rámcových oblastí, ako sú definované Kabatom a kol., tvoria zvyšky štruktúrnych slučiek, ako sú definované Chothiom a kol., pozri vyššie, môžu sa aminokyseliny prítomné v myšej protilátke vybrať na substitúciu do humanizovanej protilátky. Zvyšky, ktoré „susedia s CDR oblasťou“, zahŕňajú zvyšky aminokyselín v polohách bezprostredne susediace s jednou alebo viacerými CDR v primárnej sekvencii humanizovaného imunoglobu-

línového reťazca, napríklad v polohách bezprostredne susediacich s CDR definovaných Kabatom alebo CDR definovaných Chothiom (pozri napr. Chothia a Lesk, *JMB* 196:901 (1987)). Tieto aminokyseliny sú obzvlášť ochotné interagovať s aminokyselinami v CDR a v prípade, že sa vyberú z akceptora, zdeformovať donorné CDR a znížiť afinitu. Okrem toho môžu susediace aminokyseliny interagovať priamo s antigénom (Amit a kol., *Science*, 233:747 (1986), čo je tu zaradené ako odkaz) a voľba týchto aminokyselín z donora môže byť žiaduca z hľadiska udržania všetkých kontaktov antigénu, ktoré poskytujú afinitu u originálnej protilátky.

Zvyšky, ktoré „inak interagujú s CDR oblasťou“, zahŕňajú tie, u ktorých sa sekundárnou štruktúrnou analýzou určilo, že sú v priestorovej orientácii vhodnej na ovplyvňovanie CDR oblasti. V jednom praktickom uskutočnení sa zvyšky iné ako „inak interagujúce s CDR oblasťou“ identifikujú analýzou trojrozmerného modelu donorného imunoglobulínu (napr. modelu vytvoreného počítačom). Trojrozmerný model, obvykle pôvodnej donornej protilátky, ukazuje, že určité aminokyseliny mimo CDR sú v blízkosti CDR a majú vysokú pravdepodobnosť interakcie s aminokyselinami v CDR vodíkovou väzbou, Van de Waalsovými silami, hydrofóbnou interakciou atď. V týchto polohách aminokyselín sa môže vybrať skôr aminokyselina donorného imunoglobulínu než aminokyselina akceptorného imunoglobulínu. Aminokyseliny podľa tohto kritéria budú vo všeobecnosti mať nejaký atóm bočného reťazca vo vzdialenosti do 3 angströmových jednotiek (Å) od niektorého atómu v CDR a musia obsahovať atóm, ktorý by mohol interagovať s atómami CDR pomocou existujúcich chemických síl, aké sú uvedené vyššie.

V prípade atómov, ktoré môžu tvoriť vodíkovú väzbu, tieto 3 Å sa merajú medzi ich jadrami, avšak pre atómy, ktoré netvoria väzbu, sa tieto 3 Å merajú medzi ich Van der Waalsovými povrchmi. V druhom prípade teda jadrá musia byť vo vzdialenosti asi do 6 Å (3 Å plus súčet Van de Waalsových polomerov) pre tie atómy, ktoré sa považujú za schopné interakcie. V mnohých prípadoch budú jadrá od seba vzdialené od 4 alebo 5 do 6 Å. Pri zisťovaní, či aminokyselina môže interagovať s CDR, je výhodné neuvažovať posledných 8 aminoky-

selín CDR2 ťažkého reťazca ako časť CDR, pretože z hľadiska štruktúry sa týchto 8 aminokyselín správa skôr ako časť rámcovej oblasti.

Aminokyseliny, ktoré sú schopné interagovať s aminokyselinami v CDR, sa môžu identifikovať aj iným spôsobom. Plocha povrchu prístupná pre rozpúšťadlo každej aminokyseliny rámcovej oblasti sa vypočíta dvoma spôsobmi: (1) v intaktnej protilátke a (2) v hypotetickej molekule tvorenej protilátkou s odstránenými CDR. Významný rozdiel asi 10 štvorcových angströmov alebo viac medzi týmito číslami ukazuje, že prístup aminokyselín rámcovej oblasti k rozpúšťadlu je aspoň sčasti blokový CDR, čo znamená, že táto aminokyselina je v kontakte s CDR. Plocha povrchu aminokyseliny prístupná pre rozpúšťadlo sa môže vypočítať na základe trojrozmerného modelu protilátky, pričom sa použije algoritmus známy v problematike (napr. Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16:548 (1983) a Lee a Richards, *J. Mol. Biol.* 55:379 (1971), obidva sú tu zaradené ako odkaz). Aminokyseliny rámcovej oblasti môžu tiež niekedy interagovať s CDR nepriamo ovplyvňovaním konformácie inej aminokyseliny rámcovej oblasti, ktorá je následne v kontakte s CDR.

Je známe, že aminokyseliny v niekoľkých polohách v rámcovej oblasti sú schopné interakcie s CDR v mnohých protilátkach (Chothia a Lesk, pozri vyššie, Chothia a kol., pozri vyššie, a Tramontano a kol., *J. Mol. Biol.* 215:175 (1990), všetky sú tu zaradené ako odkaz). Je predovšetkým známe, že aminokyseliny v polohách 2, 48, 64 a 71 ľahkého reťazca a 26 - 30, 71 a 94 ťažkého reťazca (číslovanie podľa Kabata) sú schopné interagovať s CDR v mnohých protilátkach. Aminokyseliny v polohách 35 v ľahkom reťazci a 93 a 103 v ťažkom reťazci tiež pravdepodobne interagujú s CDR. Pri všetkých týchto číslovaných polohách je výhodnejší výber donornej aminokyseliny než akceptornej aminokyseliny (keď sa líšia) v humanizovanom imunoglobulíne. Na druhej strane určité zvyšky schopné interagovať s CDR oblasťou, ako je prvých 5 aminokyselín ľahkého reťazca, sa môže niekedy vybrať z akceptorného imunoglobulínu bez straty afinity v humanizovanom imunoglobulíne.

Zvyšky, ktoré „sa nachádzajú na rozhraní VL-VH“ alebo „skladacie zvyšky“, zahŕňajú tie zvyšky na rozhraní medzi VL a VH, ktoré definuje napríklad Novotny a Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4592-66 (1985) alebo



Chothia a kol., pozri vyššie. Nezvyklé skladacie zvyšky by sa mali vo všeobecnosti v humanizovanej protilátke zachovať, ak sa líšia od zvyškov v ľudských rámcových oblastiach.

Vo všeobecnosti sa substituuje jedna alebo dve aminokyseliny spĺňajúce vyššie uvedené kritériá. V niektorých praktických uskutočneniach sa substituujú všetky alebo väčšina aminokyselín spĺňajúcich vyššie uvedené kritériá. Niekedy je nejasné, či určitá aminokyselina spĺňa vyššie uvedené kritériá, a pripraví sa iné varianty imunoglobulínov, z ktorých jeden má túto substitúciu a druhý ju nemá. Takto pripravené varianty imunoglobulínov sa môžu skúšať ktoroukoľvek z tu opísaných skúšok na požadovanú aktivitu a môžu sa vyselektovať výhodné imunoglobulíny.

CDR oblasti v humanizovaných protilátkach sú obyčajne v zásade identické, a bežnejšie, identické s zodpovedajúcimi CDR oblasťami donornej protilátky. Hoci to nie je obyčajne žiaduce, je niekedy možné urobiť jednu alebo viac konzervatívnych substitúcií aminokyselín CDR zvyškov bez očividného ovplyvnenia väzbovej aktivity výsledného humanizovaného imunoglobulínu. Konzervatívnymi substitúciami sa myslia kombinácie, ako sú gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr, lys, arg; a phe, tyr.

Ďalšími kandidátmi na substitúciu sú aminokyseliny akceptornej ľudskej rámcovej oblasti, ktoré sú nezvyklé alebo „zriedkavé“ pre ľudský imunoglobulín v tejto polohe. Tieto aminokyseliny sa môžu substituovať aminokyselinami z ekvivalentných polôh myšej donornej protilátky alebo z ekvivalentných polôh obvyklejších ľudských imunoglobulínov. Substitúcia môže byť napríklad žiaduca, keď aminokyselina v ľudskej rámcovej oblasti akceptorného imunoglobulínu je zriedkavá pre túto polohu a zodpovedajúca aminokyselina v donornom imunoglobulíne je bežná pre túto polohu v sekvencii ľudského imunoglobulínu; alebo keď aminokyselina akceptorného imunoglobulínu je zriedkavá pre túto polohu a zodpovedajúca aminokyselina v donornom imunoglobulíne je tiež zriedkavá v porovnaní s inými ľudskými sekvenciami. Tieto kritériá pomáhajú zaistiť, že atypická aminokyselina v ľudskej rámcovej oblasti nenaruší štruktúru protilátky. Navyše nahradením nezvyklej ľudskej aminokyseliny aminokyse-

linou z donornej protilátky, ktorá je náhodou typická pre ľudské protilátky, sa môže humanizovaná protilátka stať menej imunogénnou.

Výraz „zriedkavá“, ako sa tu používa, označuje aminokyselinu vyskytujúcu sa v tejto polohe v menej než asi 20% , ale obvykle v menej než asi 10 % sekvencií v reprezentatívnej vzorke sekvencií, a výraz „bežná“, ako sa tu používa, označuje aminokyselinu vyskytujúcu sa vo viac než asi 25 %, ale obvykle vo viac než asi 50 % sekvencií v reprezentatívnej vzorke. Všetky ľudské sekvencie variabilnej oblasti ľahkého, prípadne ťažkého reťazca sa roztriedia do „podskupín“ sekvencií, ktoré sú navzájom obzvlášť homológne a majú rovnaké aminokyseliny v určitých kritických polohách (Kabat a kol., pozri vyššie). Pri rozhodovaní, či aminokyselina v ľudskej akceptornej sekvencii je „zriedkavá“ alebo „bežná“ medzi ľudskými sekvenciami, bude často výhodné pokladať za akceptornú sekvenciu len ľudské sekvencie v tej istej podskupine.

Ďalšími kandidátmi na substitúciu sú aminokyseliny akceptornej ľudskej rámcovej oblasti, ktoré by sa identifikovali ako časť CDR oblasti podľa alternatívnej definície navrhutej Chothiom a kol., pozri vyššie. Ďalšími kandidátmi pre substitúciu sú aminokyseliny akceptornej ľudskej rámcovej oblasti, ktorá by sa identifikovala ako časť CDR oblasti podľa AbM definície a/alebo kontaktnej definície. Je pozoruhodné, že CDR1 vo variabilnom ťažkom reťazci je definovaná tak, že obsahuje zvyšky 26 - 32.

Ďalšími kandidátmi na substitúciu sú zvyšky akceptornej rámcovej oblasti, ktoré zodpovedajú zriedkavému alebo nezvyklému zvyšku donornej rámcovej oblasti. Zriedkavé alebo nezvyklé zvyšky donornej rámcovej oblasti sú tie, ktoré sú zriedkavé alebo nezvyklé (ako je tu definované) pre myšie protilátky v tejto polohe. Pre myšie protilátky sa podskupina môže určiť podľa Kabata a identifikovaných polôh zvyškov, ktoré sa líšia od konsenzu. Tieto rozdiely špecifické pre donor môžu poukazovať na somatické mutácie v myšej sekvencii, ktoré zvyšujú aktivitu. Zachovávajú sa nezvyklé zvyšky, o ktorých sa predpokladá, že ovplyvňujú afinitu väzby, kým zvyšky, o ktorých sa predpokladá, že nie sú dôležité pre väzbu, sa môžu substituovať.

Ďalšími kandidátmi na substitúciu sú nezáradočné zvyšky vyskytujúce sa v akceptornej rámcovej oblasti. Keď napríklad reťazec akceptornej protilátky (t.j. reťazec ľudskej protilátky, ktorý má významnú identitu sekvencie s reťazcom donornej protilátky) sa porovná s reťazcom zárodočnej protilátky (ktorá má podobne významnú identitu sekvencie s donorným reťazcom), zvyšky, ktoré sa nezhodujú medzi rámcovou oblasťou akceptorného reťazca a rámcovou oblasťou zárodočného reťazca, sa môžu substituovať zodpovedajúcimi zvyškami zo zárodočnej sekvencie.

Čo sa týka iných ako špecifických substitúcií aminokyselín diskutovaných vyššie, rámcové oblasti humanizovaných imunoglobulínov sú obvykle v zásade identické, obvyklejšie identické s rámcovými oblasťami ľudských protilátok, z ktorých boli odvodené. Samozrejme, mnohé z aminokyselín v rámcovej oblasti priamo prispievajú málo alebo vôbec neprispievajú k špecifícite alebo afinite protilátky. Mnoho individuálnych konzervatívnych substitúcií zvyškov rámcovej oblasti sa tak môže tolerovať bez zjavnej zmeny špecificity alebo afinity výsledného humanizovaného imunoglobulínu. V jednom praktickom uskutočnení teda variabilná rámcová oblasť humanizovaného imunoglobulínu má aspoň 85 % identitu sekvencie so sekvenciou ľudskej variabilnej rámcovej oblasti alebo sa takéto sekvencie zhodujú. v inom praktickom uskutočnení má variabilná rámcová oblasť humanizovaného imunoglobulínu aspoň 90%, výhodne 95%, výhodnejšie 96%, 97%, 98% alebo 99% identitu sekvencii so sekvenciou ľudskej variabilnej rámcovej oblasti alebo sa také sekvencie zhodujú. Vo všeobecnosti sú však také substitúcie nežiaduce.

Humanizované protilátky výhodne prejavujú špecifickú väzbovú afinitu na antigén aspoň  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  alebo  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Horný limit väzbovej afinity humanizovaných protilátok na antigén je obvyčajne trojnásobkom, štvornásobkom alebo päťnásobkom hodnoty donorného imunoglobulínu. Dolný limit väzbovej afinity je tiež často trojnásobkom, štvornásobkom alebo päťnásobkom hodnoty donorného imunoglobulínu. Väzbová afinita sa môže tiež porovnať s afinitou humanizovanej protilátky, ktorá nemá žiadne substitúcie (napr. protilátka, ktorá má donorné CDR a akceptorné FR, ale žiadne FR substitúcie). V takýchto prípadoch je väzba optimalizovanej protilátky (so substitúciami) výhodne as-

poň dvakrát až trikrát väčšia alebo trikrát až štyrikrát väčšia než väzba nesubstituovanej protilátky. Na porovnanie sa môže stanoviť aktivita rozličných protilátok, napríklad pomocou BIACORE (t.j. povrchová plazmonová rezonancia pomocou neoznačených činidiel) alebo kompetičná väzbová skúška.

### C. Príprava humanizovaných 3D6 protilátok

Výhodné praktické uskutočnenie tohto vynálezu predstavuje humanizovanú protilátku k N-koncu A $\beta$ , menovite na použitie v tu opísaných terapeutických a/alebo diagnostických metodológiách. Zvlášť výhodným východiskovým materiálom na prípravu humanizovaných protilátok je 3D6. 3D6 je špecifický pre N-koniec A $\beta$  a ukázalo sa, že sprostredkuje fagocytózu (napr. indukuje fagocytózu) amyloidových plakov (pozri príklady 1 - 5). Klonovanie a sekvenovanie cDNA kódujúcej variabilné oblasti ťažkého a ľahkého reťazca 3D6 protilátky je opísané v príklade 6.

Vhodné sekvencie ľudskej akceptornej protilátky sa identifikujú počítačovými porovnaniami sekvencií aminokyselín myších variabilných oblastí so sekvenciami známych ľudských protilátok. Porovnanie sa vykoná oddelene pre ťažký a ľahký reťazec, ale princípy sú podobné pre obidva. Variabilné domény z ľudských protilátok, ktorých sekvencie rámcových oblastí prejavujú vysoký stupeň identity sekvencií s myšími rámcovými oblasťami VL a VH, sa identifikovali dopytom v Kabatovej databáze pomocou NCBI BLAST (verejne dostupné cez NCBI internetový server Národného inštitútu zdravia) s príslušnými sekvenciami myších rámcových oblastí. V jednom praktickom uskutočnení sa vyberú akceptorne sekvencie, ktoré majú väčšiu než 50% identitu sekvencií s myšími donornými sekvenciami. Výhodne sa vyberú sekvencie akceptorných protilátok, ktoré majú rovnakých 60 %, 70 %, 80 %, 90 % a viac.

Počítačové porovnanie 3D6 ukázalo, že ľahký reťazec 3D6 prejavuje najväčšiu identitu sekvencií s ľudským subtypom ľahkého reťazca kapa II, a to, že ťažký reťazec 3D6 prejavuje najväčšiu identitu sekvencií s ľudskými ťažkými reťazcami subtypu II, ako sú definované Kabatom, pozri vyššie. Takže ľahká a ťažká ľudská rámcová oblasť sú výhodne odvodené od ľudských protilátok

týchto subtypov alebo z konsenzuálnych sekvencií takých subtypov. Výhodné ľudské variabilné oblasti ľahkého reťazca prejavujúce najväčšiu identitu sekvencií s zodpovedajúcou oblasťou z 3D6 sú z protilátok, ktoré majú Kabatove ID čísla 019230, 005131, 005058, 005057, 005059, U21040 a U41645, pričom 019230 je výhodnejší. Výhodné ľudské variabilné oblasti ťažkého reťazca prejavujúce najväčšiu identitu sekvencií s zodpovedajúcou oblasťou z 3D6 sú protilátky, ktoré majú Kabatove ID čísla 045919, 000459, 000553, 000386 a M23691, pričom 045919 je výhodnejší.

Zvyšky na substitúciu sa ďalej vyberajú nasledujúcim spôsobom. Keď sa aminokyselina líši medzi 3D6 variabilnou rámcovou oblasťou a ekvivalentnou ľudskou variabilnou rámcovou oblasťou, potom aminokyselina ľudskej rámcovej oblasti by mala byť obvykle substituovaná ekvivalentnou myšou aminokyselinou, ak sa dá rozumne predpokladať, že táto aminokyselina:

- (1) nekovalentne viaže antigén priamo,
- (2) susedí s CDR oblasťou, je časťou CDR oblasti v zmysle alternatívnej definície navrhnutej Chothiom a kol., pozri vyššie, alebo inak interaguje s CDR oblasťou (napr. do vzdialenosti asi 3 Å CDR oblasti) (napr. aminokyseliny v polohách L2, H49 a H94 z 3D6), alebo
- (3) nachádza sa na rozhraní VL-VH (napr. aminokyseliny v polohách L36, L46 a H93 z 3D6).

Počítačové modelovanie variabilných oblastí ťažkého a ľahkého reťazca 3D6 protilátky a humanizácia 3D6 protilátky sú opísané v príklade VII. V stručnosti, vytvoril sa trojrozmerný model založený na najbližších vyriešených štruktúrach myších protilátok pre ťažké a ľahké reťazce. Na tento účel sa zvolila protilátka označená 1CR9 (Protein Data Bank (PDB) ID: 1CR9, Kanyo a kol., *J. Mol. Biol.* 293:855 (1999)) ako vzor na modelovanie 3D6 ľahkého reťazca a protilátka označená 1OPG (PDB ID: 1OPG, Kodandapani a kol., *J. Biol. Chem.* 270:2268 (1995)) ako vzor na modelovanie ťažkého reťazca. Model sa ďalej zdokonalil sériou krokov minimalizujúcich energiu, čo odstránilo nevýhodné kontakty atómov a optimalizovalo elektrostatické a Van der Waalsove interakcie. Vyriešená štruktúra 1qkz (PDB ID: 1QKZ, Derrick a kol., *J. Mol.*

*Biol.* 293:81 (1999) sa zvolila ako vzor na modelovanie CDR3 ťažkého reťazca, keďže 3D6 a 10PG neprejavili významnú homológiu sekvencií, keď sa tieto zorientovali na porovnanie.

Trojrozmerná štruktúrna informácia pre tu opísané protilátky je verejne dostupná, napríklad z Protein Bank (Proteínovej banky) (PDB) v Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (Spoločnom výskumnom laboratóriu pre štruktúrnú bioinformatiku). PDB je voľne dostupná cez World Wide Web internet a je opísaná Bermanom a kol., (2000) *Nucleic Acids Research*, 28:235. Počítačové modelovanie umožňuje identifikáciu zvyškov interagujúcich s CDR. Počítačový model štruktúry 3D6 môže následne slúžiť ako východiskový bod na predpovedanie trojrozsomernej štruktúry protilátky obsahujúcej komplementaritu určujúce oblasti 3D6 substituované v štruktúrach ľudskej rámcovej oblasti. Môžu sa skonštruovať ďalšie modely, ktoré reprezentujú štruktúru, keď sa zavedú ďalšie substitúcie aminokyselín.

Vo všeobecnosti je žiaduce substituovať jednu, väčšinu alebo všetky aminokyseliny spĺňajúce vyššie uvedené kritériá. Humanizované protilátky podľa tohto vynálezu budú teda obvykle obsahovať substitúciu zvyšku rámcovej oblasti ľudského ľahkého reťazca s zodpovedajúcim zvyškom 3D6 aspoň v 1,2 alebo 3 a obvyklejšie v 4 z nasledujúcich polôh: L1, L2, L36 a L46. Humanizované protilátky tiež obvykle obsahujú substitúciu zvyšku rámcovej oblasti ľudského ťažkého reťazca zodpovedajúcim zvyškom 3D6 aspoň v 1, 2 a niekedy v 3 z nasledujúcich polôh: H49, H93 a H94. Humanizované protilátky môžu tiež obsahovať substitúciu zvyšku rámcovej oblasti ťažkého reťazca zodpovedajúcim zárodočným zvyškom aspoň v 1,2 a niekedy v 3 z nasledujúcich polôh: H74, H77 a H89.

Niekedy je však nejasné, či určitá aminokyselina spĺňa vyššie uvedené kritériá, a pripravujú sa iné varianty imunoglobulínov, z ktorých jeden má túto substitúciu a druhý ju nemá. V prípadoch, keď by substitúcia myším zvyškom zaviedla zvyšok, ktorý je zriedkavý v ľudských imunoglobulínoch v konkrétnej polohe, môže byť žiaduce otestovať protilátku na aktivitu s týmto zvyškom a bez neho. Ak aktivita (napr. väzbová afinita a/alebo väzbová špecificita) sú približne rovnaké so substitúciou a bez nej, potom sa môže preferovať protilát-

ka bez substitúcie, keďže sa dá očakávať, že vyvolá menšiu HAHA odozvu, ako sa tu opisuje.

Ďalšími kandidátmi na substitúciu sú aminokyseliny akceptornej ľudskej rámcovej oblasti, ktoré sú nezvyklé pre ľudský imunoglobulín v tejto polohe. Tieto aminokyseliny sa môžu substituovať aminokyselinami z ekvivalentných polôh typickejších ľudských imunoglobulínov. Aminokyseliny z ekvivalentných polôh myšieho 3D6 sa môžu zaviesť do ľudských rámcových oblastí, keď sú takéto aminokyseliny obvyklé pre ľudský imunoglobulín v ekvivalentných polohách.

V ďalších praktických uskutočneniach, keď akceptorným imunoglobulínom rámcovej oblasti ľudského ľahkého reťazca je Kabat ID číslo 019230, obsahuje ľahký reťazec substitúcie aspoň v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 alebo bežnejšie v 13 z nasledujúcich polôh: L7, L10, L12, L15, L17, L39, L45, L63, L78, L83, L85, L100 alebo L104. V ďalších praktických uskutočneniach, keď akceptorným imunoglobulínom rámcovej oblasti ľudského ťažkého reťazca je Kabat ID číslo 045919, obsahuje ťažký reťazec substitúcie aspoň v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo bežnejšie v 15 z nasledujúcich polôh: H3, H5, H13, H16, H40, H41, H42, H44, H72, H77, H82A, H83, H84 alebo H108. Tieto polohy sú substituované aminokyselinou z ekvivalentnej polohy ľudského imunoglobulínu, ktorý má typickejší aminokyselinový zvyšok. Príklady vhodných aminokyselín na substitúciu sú uvedené na obrázkoch 1 a 2.

Inými kandidátmi na substitúciu sú nezárodočné zvyšky, ktoré sa vyskytujú v rámcovej oblasti. Počítačové porovnanie 3D6 so známymi zárodočnými sekvenciami ukázalo, že ťažké reťazce vykazujúce najväčší stupeň identity sekvencií obsahujú zárodočné sekvencie variabilnej oblasti VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 a VH3-11, pričom VH3-23 je výhodnejší. Porovnanie Kabat ID 045919 s VH3-23 ukazuje, že na substitúciu zodpovedajúcimi zárodočnými zvyškami sa môžu zvoliť zvyšky H74, H77 a/alebo H89 (napr. zvyšky H74, H77 a/alebo H89, keď sa porovná Kabat ID 045919 a VH3-23). Podobne zárodočné sekvencie, ktoré majú najväčší stupeň identity s ľahkým reťazcom 3D6, obsahujú A1, A17, A18, A2 a A19, pričom A19 je výhodnejší. Zvyšky, ktoré sa nezhodujú medzi zvolenou akceptornou rámcovou oblasťou ľahkého reťazca a

jednou z týchto zárodočných sekvencií, by sa mohli vybrať na substitúciu zodpovedajúcim zárodočným zvyškom.

V tabuľke 1 je zhrnutá sekvenčná analýza VH a VL oblastí 3D6. Sú tu uvedené ďalšie myšie a ľudské štruktúry, ktoré sa môžu použiť na počítačové modelovanie 3D6 protilátky, a ďalšie ľudské protilátky, rovnako ako aj zárodočné sekvencie, ktoré sa môžu použiť pri voľbe substitúcií aminokyselín. Zriedkavé myšie zvyšky sú tiež uvedené v tabuľke 1. Zriedkavé myšie zvyšky sa identifikujú porovnaním donorných VL a/alebo VH sekvencií so sekvenciami iných prvkov podskupiny, do ktorej tieto donorné VL a/alebo VH sekvencie patria (podľa Kabata), a identifikáciou polôh zvyškov, ktoré sa líšia od konsenzu. Tieto špecifické rozdiely donora môžu ukázať na somatické mutácie, ktoré zvyšujú aktivitu. Nezvyklé alebo zriedkavé zvyšky v blízkosti väzbového miesta sa môžu prípadne dostať do styku s antigénom, čím sa stáva zachovanie myšieho zvyšku žiaducim. Ak však nezvyklý myší zvyšok nie je dôležitý pre väzbu, potom sa uprednostní použitie zodpovedajúceho akceptorného zvyšku, keďže myší zvyšok môže vytvoriť imunogénne neoepitopy v humanizovanej protilátke. V situácii, keď nezvyklý zvyšok v donornej sekvencii je v skutočnosti bežným zvyškom v zodpovedajúcej akceptornej sekvencii, potom preferovaným zvyškom je jasne akceptorný zvyšok.

Tabuľka 1: Prehľad V-oblasti sekvencie 3D6

| Reťazec                                                   | Ťažký                                                                                                   | Ľahký                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Myšia podskupina<br>(Kabatova sekv. ID č.)                | IIID (002688)                                                                                           | II (005840-005844, 005851-005853, 005857, 005863)                                                   |
| Myšie homológy<br>(Kabat/Genbank)                         | 002727/163.1'CL<br>002711/H35-C6'CL<br>002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL<br>002715/ASWA2'CL<br>020669/#14'CL | 005840/1210.7<br>005843/42.4b.12.2'CL<br>005842/BXW-14'CL<br>005841/42.7B3.2'CL<br>005851/36-60CRI- |
| Zriedkavé aminokyseliny (frekvencia výskytu v triede v %) | N40 (0,233 %)<br>D42 (0,699 %)                                                                          | Y1 (0,35 %)<br>I15 (3,3 %)<br>D27 (0,867 %)-CDR1<br>I78 (0,677 %)<br>L85 (0,625 %)                  |



|                                                            |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                            |                                                                                                                                                        | W89 (0,815 %)-CDR3<br>K106A (0,295 %)                                                                                                                                  |
| Ľudská podskupina                                          | III (000488-000491, 000503, 000624)                                                                                                                    | II (005046)                                                                                                                                                            |
| Chothiovo kánonické rozdelenie CDR do skupín [príklad pdb] | H1: trieda 1 [2fbj]<br>H2: trieda 3 [1ige]                                                                                                             | L1: trieda 4 [1rmf]<br>L2: trieda 1 [1lmk]<br>L3: trieda 1 [1tet]                                                                                                      |
| Najbližšia vyriešená myšia štruktúra                       | PDB ID: 1OPG Kodandapani a kol.,<br>pozri vyššie; (72 % 2Å)                                                                                            | PDB ID: 1CR9; Kanyo a kol.,<br>pozri vyššie (94 %, 2Å)<br><br>PDB ID: 1NLD; Davies a kol.,<br><i>Acta Crystallog. D. Biol. Crystallog.</i> 53:186 (1997); (98 %, 2,8Å) |
| Najbližšia vyriešená ľudská štruktúra                      | 1VH (68 %, nmr)<br>443560 (65 %, IgG, λ myelóm, 1,8Å)<br>KOL/2FB4H (60 %, myelóm, 3Å)                                                                  | 1LVE (57 %, LEN)<br>1B6DA (54 %, B-J dimér, 2,8Å);<br>1VGEL (54 %, autoAb)                                                                                             |
| Výsledky zárodočného dopytu (Hu) (prvé 4)                  | VH3-48 (4512283/BAA75032.1)<br>VH3-23 (4512287/BAA75046.1)<br>VH3-7 (4512300/BAA75056.1)<br>VH3-21 (4512287/BAA75047.1)<br>VH3-11 (4152300/BAA75053.1) | A1 (x63402)<br>A17 (x63403)<br>A18 (x63396)<br>A2 (x31952)<br>A19 (x63397)                                                                                             |

\*ťažký reťazec a ľahký reťazec z tej istej protilátky (O-81, Hirabayashi a kol., *NAR* 20:2601).

Tu uvedené odkazy na Kabat ID sekvencie sú verejne dostupné, napríklad v Kabatovej databáze sekvencií imunologicky zaujímavých proteínov na Katedre biomedicínskeho inžinierstva, Northwestern University. Je tu verejne dostupná trojrozmerná štruktúrna informácia pre protilátky z Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (PDB). PDB je voľne prístupná cez World Wide Web internet a je opísaná Bermanom a kol. (2000) *Nucleic Acids Research*, s. 235-242. Tu uvedené odkazy na zárodočné génové sekvencie sú verejne dostupné, napríklad z databázy sekvencií National Center for Biotechnology Information (NCBI) v zbierkach Igh, Ig kapa a Ig lambda zárodočných V génov (ako oddelenie National Library of Medicine (Národnej knižnice medicíny (NLM) pri Národných inštitútoch zdravia (NIH)). Hľadanie homológie v NCBI databáze „Ig zárodočné gény“ sa vykonáva pomocou IgG BLAST™.

Vo výhodnom praktickom uskutočnení obsahuje humanizovaná protilátka tohto vynálezu (i) ľahký reťazec s variabilnou doménou obsahujúcou myšie VL 3D6 CDR a ľudskú akceptornú rámcovú oblasť, pričom táto rámcová oblasť má aspoň jeden, výhodne dva, tri alebo štyri zvyšky vybraté zo skupiny obsahujúcej L1, L2, L36 a L46 substituované zodpovedajúcim 3D6 zvyškom, a (ii) ťažký reťazec obsahujúci VH 3D6 CDR a ľudskú akceptornú rámcovú oblasť, pričom táto rámcová oblasť má aspoň jeden, výhodne dva alebo tri zvyšky vybraté zo skupiny obsahujúcej H49, H93 a H94 substituované zodpovedajúcim 3D6 zvyškom, a prípadne aspoň jeden, výhodne dva alebo tri zvyšky zo skupiny obsahujúcej H74, H77 a H89 sú substituované zodpovedajúcim ľudským zárodočným zvyškom.

Vo výhodnejšom praktickom uskutočnení obsahuje humanizovaná protilátka tohto vynálezu (i) ľahký reťazec s variabilnou doménou obsahujúcou myšie CDR VL 3D6 a ľudskú akceptornú rámcovú oblasť, pričom táto rámcová oblasť má zvyšok 1 substituovaný tyr (Y), zvyšok 2 substituovaný val (V), zvyšok 36 substituovaný leu (L) a/alebo zvyšok 46 substituovaný arg (R), a (ii) ťažký reťazec obsahujúci CDR VH 3D6 a ľudskú akceptornú rámcovú oblasť, pričom táto rámcová oblasť má zvyšok 49 substituovaný ala (A), zvyšok 93 substituovaný val (V), a/alebo zvyšok 94 substituovaný arg (R), a prípadne má zvyšok 74 substituovaný ser (S), zvyšok 77 substituovaný thr (T) a/alebo zvyšok 89 substituovaný val (V).

Vo zvlášť výhodnom praktickom uskutočnení má humanizovaná protilátka tohto vynálezu tu opísané štruktúrne znaky a ďalej má aspoň jednu (výhodne dve, tri, štyri alebo všetky) z nasledujúcich aktivít: (1) viaže agregovaný A $\beta$ 1-42 (napr. ako sa stanoví metódou ELISA); (2) viaže A $\beta$  v plakoch (napr. farbenie AD a/alebo PDAPP plakov); (3) viaže A $\beta$  s dvoj- až trojnásobne vyššou väzbovou afinitou v porovnaní s chimérickým 3D6 (napr. 3D6, ktorý má myšie CDR a ľudskú akceptornú FR); (4) sprostredkuje fagocytózu A $\beta$  (napr. vo fagocytóznej skúške *ex vivo*, ako sa tu opisuje); a (5) prechádza cez hematoencefalitickú bariéru (napr. prejavuje krátkodobú mozgovú lokalizáciu napríklad v PDAPP zvieracom modeli, ako sa tu opisuje).

V inom praktickom uskutočnení má humanizovaná protilátka tohto vynálezu tu opísané štruktúrne znaky, viaže A $\beta$  takým spôsobom alebo s takou afinitou, ktorá je dostatočná na vyvolanie aspoň jedného z nasledujúcich účinkov *in vivo*: (1) znižuje množstvo A $\beta$  plakov; (2) zabraňuje tvorbe plakov; (3) znižuje hladinu rozpustného A $\beta$ ; (4) obmedzuje neuritickú patológiu spojenú s amyloidogénnym ochorením; (5) znižuje alebo zlepšuje aspoň jeden fyziologický príznak súvisiaci s amyloidogénnym ochorením; a/alebo (6) zlepšuje kognitívnu funkciu.

V inom praktickom uskutočnení má humanizovaná protilátka tohto vynálezu tu opísané štruktúrne vlastnosti a špecificky sa viaže na epitop obsahujúci zvyšky A $\beta$  1-5 alebo 3-7.

### 3. Ľudské protilátky

Ľudské protilátky proti A $\beta$  poskytuje rad nižšie opísaných techník. Niektoré ľudské protilátky sú vyselektované kompetičnými väzbovými experimentami alebo inak, aby mali rovnakú epitopovú špecifickosť ako určitá myšia protilátka, napríklad jedna z tu opísaných myších monoklonálnych protilátok. Ľudské protilátky sa tiež môžu triediť na určitú epitopovú špecifickosť použitím samotného fragmentu A $\beta$  ako imunogénu a/alebo triedením protilátok proti zbierke delečných mutantov A $\beta$ . Ľudské protilátky majú výhodne špecifickosť ľudského IgG1 izotypu.

#### a. Triómová metodológia

Základný prístup a ukážkového partnera bunkovej fúzie SPAZ-4 na použitie v tomto prístupe opísal Oestberg a kol., *Hybridoma* 2:361 (1983); Oestberg, patent USA č. 4,634,664; a Engleman a kol., patent USA 4,634,666 (všetky sú tu zaradené ako odkaz vo svojej celosti a na všetky účely). Bunkové línie produkujúce protilátky získané touto metódou sa nazývajú triómy, pretože pochádzajú z troch buniek: dvoch ľudských a jednej myšej. Najprv sa línia myšieho myelómu fúzuje s ľudským B-lymfocytom, čím sa získa protilátku neprodukujúca xenogénna hybridná bunka, ako je bunková línia SPAZ-4 opísaná O-

estbergom, pozri vyššie. Xenogénna bunka sa potom fúzuje s imunizovaným B-lymfocytom, čím sa získa protilátku produkujúca triómová bunková línia. Zistilo sa, že triómy produkujú protilátku stabilnejšie ako obyčajné hybridómy pripravené z ľudských buniek.

Imunizované B-lymfocyty sa získajú z krvi, sleziny, lymfatických uzlín alebo kostnej drene ľudského darcu. Ak sa vyžadujú protilátky na špecifický antigén alebo epitop, je výhodné použiť tento antigén alebo jeho epitop na imunizáciu. Imunizácia môže byť buď *in vivo* alebo *in vitro*. Na *in vivo* imunizáciu sa obvykle izolujú B bunky z človeka imunizovaného A $\beta$ , jeho fragmentom, dlhším polypeptidom obsahujúcim A $\beta$  alebo fragment, alebo anti-idiotypovou protilátkou k protilátke k A $\beta$ . Pri niektorých metódach sa B bunky izolujú z rovnakého pacienta, ktorému sa nakoniec podáva protilátková terapia. Pri *in vitro* imunizácii sa obvykle na B-lymfocyty pôsobí antigénom počas 7-14 dní v prostredí, ako je RPMI-1640 (pozri Engleman, vyššie) s prídavkom 10 % ľudskej plazmy.

Imunizované B-lymfocyty sa fúzujú s xenogénnou hybridnou bunkou, ako je SPAZ-4 pomocou dobre známych metód. Napríklad sa na bunky pôsobí 40-50 % polyetylén glykolom s MW 100-4000 asi pri 37 stupňoch C po dobu asi 5-10 minút. Bunky sa oddelia od fúznej zmesi a množia sa v prostredí selektívnom pre požadované hybridy (napr. HAT alebo AH). Klony vylučujúce protilátky, ktoré majú vyžadované väzbovú špecifickosť, sa identifikujú skúšaním triómového kultivačného média na schopnosť viazať sa na A $\beta$  alebo jeho fragment. Triómy produkujúce ľudské protilátky, ktoré majú vyžadovanú špecifickosť, sa subklonujú limitnou zried'ovacou technikou a kultivujú sa *in vitro* v kultivačnom médiu. Získaná triómová bunková línia sa potom skúša na schopnosť viazať A $\beta$  alebo jeho fragment.

Hoci triómy sú geneticky stabilné, neprodukujú protilátky vo veľmi veľkých množstvách. Hladiny expzie sa môžu zvýšiť klonovaním génov protilátky z triómov do jedného alebo viacerých expresných vektorov a transformovaním vektora do štandardnej bunkovej línie cicavca, alebo bakteriálnej alebo kvasinkovej bunkovej línie.

### b. Transgenické nečlovečie cicavce

Ľudské protilátky na A $\beta$  sa môžu tiež pripraviť z nečlovečích transgenických cicavcov, ktoré majú transgény zakódované aspoň segmentom ľudského imunoglobulínového lokusu. Endogénny imunoglobulínový lokus takýchto transgenických cicavcov je obvykle funkčne inaktivovaný. Segment ľudského imunoglobulínu obsahuje nepreskúpené sekvencie zložiek ťažkého a ľahkého reťazca. Inaktivácia endogénnych imunoglobulínových génov a zavedenie exogénnych imunoglobulínových génov sa môže dosiahnuť cielenou homológnou rekombináciou alebo zavedením YAC chromozómov. Transgenické cicavce, ktoré sú výsledkom tohto procesu, sú schopné funkčne preskupiť sekvencie imunoglobulínových zložiek a exprimovať repertoár protilátok rozličných izotypov zakódovaných génmi ľudského imunoglobulínu, bez expresie endogénnych imunoglobulínových génov. Príprava a vlastnosti cicavcov, ktorí majú tieto vlastnosti, sú podrobne opísané napr. v Lonberg a kol., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148:1547 (1994), *Nature Biotechnology* 14:826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (všetky sú tu zaradené ako odkaz vo svojej celosti na všetky účely). Transgenické myši sú zvlášť vhodné. Anti-A $\beta$  protilátky sa získajú imunizáciou transgenického nečlovečieho cicavca, ako opisuje Lonberg alebo Kucherlapati, pozri vyššie, A $\beta$  alebo jeho fragmentom. Monoklonálne protilátky sa pripravujú napr. fúzaním B buniek z takýchto cicavcov s vhodnou bunkovou líniou myelómu pomocou bežnej Kohler-Milsteinovej technológie. Ľudské polyklonálne protilátky sa môžu tiež získať vo forme séra z ľudí imunizovaných imunogénnym činidlom. Takéto polyklonálne protilátky sa môžu prípadne zakoncentrovať afinitným čistením pomocou A $\beta$  alebo iného amyloidného peptidu ako afinitného činidla.

### c. Metódy „phage display“

Ďalším prístupom na získanie ľudských anti-A $\beta$  protilátok je skríning knižnice DNA z ľudských B buniek podľa všeobecného protokolu, ktorý navrhol Huse a kol., *Science* 246:1275-1281 (1989). Ako je opísané pre triómovú technológiu, takéto B bunky sa môžu získať z človeka imunizovaného A $\beta$ , z fragmentov, dlhších polypeptidov obsahujúcich A $\beta$  alebo fragmenty, alebo z anti-idiotypových protilátok. Takéto B bunky sa prípadne získajú z pacienta, ktorému sa nakoniec podáva protilátková terapia. Vyselektujú sa protilátky viažuce sa na A $\beta$  alebo na jeho fragment. Sekvencie kódujúce takéto protilátky (alebo väzbové fragmenty) sa potom klonujú a amplifikujú. Protokol opísaný Husem sa stane účinnejším v kombinácii s technológiou phage-display. Pozri napr. Dower a kol., WO 91/17271, McCafferty a kol., WO 92/01047, Herzig a kol., US 5,877,218, Winter a kol., US 5,871,907, Winter a kol., US 5,858,657, Holliger a kol., US 5,837,242, Johnson a kol., US 5,733,743 a Hoogenboom a kol., US 5,565,332 (všetky sú tu zaradené ako odkaz vo svojej celosti na všetky účely). V týchto metódach sa vytvoria knižnice fágov, v ktorých členy predstavujú rozličné protilátky na svojich vonkajších povrchoch. Protilátky sú väčšinou predstavené ako Fv alebo Fab fragmenty. Protilátky predstavené fágom s vyžadovanou špecificitou sa vyselektujú pomocou afinitného obohatenia k peptidu A $\beta$  alebo k jeho fragmentu.

Vo variante phage-display metódy sa môžu pripraviť ľudské protilátky, ktoré majú väzbovú špecificitu vybratej myšej protilátky. Pozri Winter, WO 92/20791. V tejto metóde sa ako východiskový materiál použije variabilná oblasť buď ťažkého alebo ľahkého reťazca vybratej myšej protilátky. Ak sa napríklad ako východiskový materiál zvolí variabilná oblasť ľahkého reťazca, potom sa vytvorí knižnica fágov, v ktorej členy predstavujú rovnakú variabilnú oblasť ľahkého reťazca (t.j. myší východiskový materiál) a odlišnú variabilnú oblasť ťažkého reťazca. Variabilné oblasti ťažkého reťazca sa získajú z knižnice preskupených variabilných oblastí ľudského ťažkého reťazca. Vyberie sa fág vykazujúci silnú špecifickú väzbu na A $\beta$  (napr. aspoň  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Variabilná oblasť ľudského ťažkého reťazca z tohto fágu potom slúži ako východiskový materiál na zostavenie ďalšej knižnice fágov. V tejto knižnici každý fág predstavuje rovnakú variabilnú oblasť ťažkého reťazca (t.j. oblasť identifikovanú z prvej vystavenej knižnice) a odlišnú variabilnú oblasť ľahkého reťazca. Varia-

bilné oblasti ľahkého reťazca sa získajú z knižnice preskupených oblastí ľudského variabilného ľahkého reťazca. Opäť sa vyberie fág vykazujúci silnú špecifickú väzbu na A $\beta$ . Tieto fágy predstavujú variabilné oblasti kompletných ľudských anti-A $\beta$  protilátok. Tieto protilátky obvykle majú rovnakú alebo podobnú epitopovú špecificitu ako myši východiskový materiál.

#### 4. Príprava variabilných oblastí

Ak sú v princípe vybraté CDR a rámcové oblasti humanizovaných imunoglobulínov, existuje veľa metód na prípravu takýchto imunoglobulínov. Kvôli degenerácii kódu bude rad sekvencií nukleových kyselín kódovať každú sekvenciu aminokyselín imunoglobulínu. Požadované sekvencie aminokyselín je možné pripraviť *de novo* syntézou DNA v tuhej fáze alebo PCR mutagenézou skôr pripraveného variantu požadovaného nukleotidu.

Mutagenéza sprostredkovaná oligonukleotidom je výhodnou metódou na prípravu substitučných, delečných a inzerčných variantov DNA terčového polypeptidu. Pozri Adelman a kol., *DNA2:183* (1983). V stručnosti, DNA terčového polypeptidu sa mení hybridizáciou oligonukleotidu kódujúceho požadovanú mutáciu na vzore jednoduchého reťazca DNA. Po hybridizácii sa použije DNA polymeráza na syntézu úplného druhého komplementárneho reťazca vzoru, ktorý obsahuje primér oligonukleotidu a kóduje zvolené alternácie v DNA terčového polypeptidu.

#### 5. Výber konštantných oblastí

Variabilné segmenty protilátok, ktoré sa pripravlia podľa vyššie uvedeného opisu (napr. variabilné oblasti ťažkých a ľahkých reťazcov chimérickej, humanizovanej alebo ľudskej protilátky) sa obvykle pospájajú aspoň do časti konštantnej oblasti (Fc) imunoglobulínu, obvykle do konštantnej oblasti ľudského imunoglobulínu. Sekvencie DNA ľudskej konštantnej oblasti sa môžu izolovať podľa dobre známych postupov z celej škály ľudských buniek, avšak výhodne z

umŕtvených B buniek (pozri Kabat a kol., vyššie a Liu a kol., WO87/02671) (každý z nich je tu zaradený ako odkaz vo svojej celosti na všetky účely). Protilátka bude spravidla obsahovať konštantné oblasti ľahkého aj ťažkého reťazca. Konštantná oblasť ťažkého reťazca obyčajne obsahuje oblasti CH1, kľb, CH2, CH3 a CH4. Tu opísané protilátky zahŕňajú protilátky, ktoré majú všetky typy konštantných oblastí, vrátane IgM, IgG, IgD, IgA a IgE a akýkoľvek izotyp, vrátane IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Voľba konštantnej oblasti závisí sčasti na tom, či sa vyžaduje protilátkovo-závislá komplementárna a/alebo bunková sprostredkovaná toxicita. Napríklad izotypy IgG1 a IgG3 majú komplementárnu aktivitu a izotypy IgG2 a IgG4 ju nemajú. Ak sa vyžaduje, aby protilátka (napr. humanizovaná protilátka) prejavovala cytotoxickú aktivitu, konštantná doména je obvykle komplement fixujúca konštantná doména a trieda je obvykle IgG1. Keď sa taká cytotoxická aktivita nevyžaduje, konštantná doména môže byť triedy IgG2. Výber izotypu môže tiež ovplyvniť prechod protilátky do mozgu. Výhodný je ľudský izotyp IgG1. Konštantné oblasti ľahkého reťazca môžu byť lambda alebo kapa. Humanizovaná protilátka môže obsahovať sekvencie z viac než jednej triedy alebo izotypu. Protilátky sa môžu exprimovať ako tetraméry obsahujúce obsahujúce dva ľahké a dva ťažké reťazce, ako samostatné ťažké reťazce, ľahké reťazce, ako Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> a Fv alebo ako jednoreťazcové protilátky, v ktorých variabilné oblasti ťažkého a ľahkého reťazca sú spojené spacerom.

#### 6. Expresia rekombinantných protilátok

Chimérické, humanizované a ľudské protilátky sa obvykle pripravujú rekombinantnou expresiou. Nukleové kyseliny kódujúce variabilné oblasti humanizovaného ľahkého a ťažkého reťazca, prípadne spojené s konštantnými oblasťami, sa zavedú do expresného vektora. Ľahké a ťažké reťazce sa môžu klonovať v rovnakých alebo rozdielnych expresných vektoroch. Segmenty DNA kódujúce imunoglobulínové reťazce sa operabilne spoja do riadiacich sekvencií v expresnom vektore (vektoroch), ktorý zabezpečuje expresiu imunoglobulínových peptidov. K expresným riadiacim sekvenciám patria, ale neobmedzujú sa iba na ne, promótor (napr. prirodzene asociované alebo heterológne promóto-



ry), signálne sekvencie, enhancerové prvky a transkripčné ukončovacie sekvencie. Sekvencie na riadenie expresie sú výhodne eukaryotické promótorové systémy vo vektoroch schopných transformácie alebo transfekcie eukaryotických hostiteľských buniek. Keď sa tento vektor už zaviedol do vhodného hostiteľa, hostiteľ sa udržiava za podmienok vhodných na vysokú úroveň expresie sekvencií nukleotidov a na oddelenie a čistenie krížovo reagujúcich protilátok.

Tieto expresné vektory sú obvykle replikovateľné v hostiteľských organizmoch buď ako epizoméry alebo ako integrálna súčasť chromozomálnej DNA hostiteľa. Expresné vektory obyčajne obsahujú selekčné markery (napr. ampicilínovej rezistencie, hygromycínovej rezistencie, tetracyklínovej rezistencie alebo neomycínovej rezistencie), čo umožňuje detegovať bunky transformované požadovanou DNA sekvenciou (pozri napr. Itakura a kol., patent USA č. 4,704,362).

*E. coli* je prokaryotický hostiteľ mimoriadne vhodný na klonovanie polynukleotidov (napr. DNA sekvencií) tohto vynálezu. Inými mikrobiálnymi hostiteľmi vhodnými na použitie sú bacily, ako je *Bacillus subtilis* a iné enterobaktérie, ako sú *Salmonella*, *Serratia* a rozličné druhy *Pseudomonas*. V týchto prokaryotických hostiteľoch sa dajú tiež urobiť expresné vektory, ktoré budú obvykle obsahovať sekvencie na riadenie expresie kompatibilné s hostiteľskou bunkou (napr. začiatok replikácie). Okrem toho môže byť prítomné ľubovoľné množstvo rozličných známych promótorov, ako je laktóзовý promótorový systém, tryptofánový (*trp*) promótorový systém, beta-laktamázový promótorový systém alebo promótorový systém z fágu lambda. Promótory budú obvykle riadiť expresiu, prípadne s operátorovou sekvenciou, a majú sekvencie ribozómových väzbových miest a pod. na inicializáciu a dokončenie transkripcie a translácie.

Iné mikróby, ako sú kvasinky, sa dajú tiež použiť na expresiu. Výhodný kvasinkový hostiteľ je *Saccharomyces* s vhodnými vektormi, ktoré majú podľa potreby sekvencie na riadenie expresie (napr. promótory), začiatok replikácie, terminačné sekvencie a podobne. K typickým promótorom patria 3-fosfoglycerátkináza a iné glykolytické enzýmy. K indukibilným kvasinkovým promótorom

patria okrem iných promótorov z alkoholdehydrogenázy, izocytochróm C a enzýmy zodpovedné za využitie maltózy a galaktózy.

Okrem mikroorganizmov sa aj tkanivo cicavcov môže použiť na expresiu a produkciu polypeptidov tohto vynálezu (napr. polynukleotidov kódujúcich imunoglobulíny alebo ich fragmenty). Pozri Winnacker, *From Genes to Clones (Od génov ku klonom)*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Eukaryotické bunky sa v skutočnosti preferujú, pretože sa vyvinulo značné množstvo vhodných hostiteľských bunkových línií v tomto odbore na sekréciu heterológnych proteínov (napr. intaktných imunoglobulínov), a patria sem bunkové línie COH, rozličné bunkové línie Cos, HeLa bunky, výhodne myelómové bunkové línie alebo transformované B bunky alebo hybridómy. Bunky sú výhodne nečlovečie. Expresné vektory pre tieto bunky obsahujú sekvencie na riadenie expresie, ako je začiatok replikácie, promótor a enhancer (Queen a kol., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) a potrebné miesta spracovania informácie, ako sú ribozómové väzbové miesta, miesta splietania RNA, polyadenylačné miesta a transkripčné terminačné sekvencie. Výhodnými sekvenciami na riadenie expresie sú promótor odvođené z imunoglobulínových génov, SV40, adenovírus, hovädzí papilomavírus, cytomegalovírus a podobne. Pozri Co a kol., *J. Immunol.* 148:1149 (1992),

Je tiež možné zabudovať sekvencie kódujúce protilátku do transgénov na zavedenie do genómu transgenického živočícha a následnú expresiu do mlieka transgenického živočícha (pozri napr. Deboer a kol., US 5,741,957, Rosen US 5,304,486 a Meade a kol., US 5,849,992). Vhodné transgény obsahujú kódovacie sekvencie pre ľahký a ťažký reťazec v operabilnom spojení s promótorom a enhancerom zo špecifického génu cicavčej žľazy, ako je kazeín alebo beta laktoglobulín.

Vektory obsahujúce zaujímavé sekvencie polynukleotidov (napr. sekvencie kódujúce ťažký a ľahký reťazec a sekvencie na riadenie expresie) sa môžu preniesť do hostiteľskej bunky známymi metódami, ktoré sa budú meniť v závislosti na bunkovom hostiteľovi. Napríklad transfekcia chloridu vápenatého sa bežne využíva pre prokaryotické bunky, kým pre iných bunkových hostiteľov sa môže použiť pôsobenie fosforečnanu vápenatého, elektroporácia, lipofekcia, biolistika alebo transfekcia na vírusovej báze. (Pozri vo všeobecnosti Sambro-

ok a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Molekulárne klonovanie: Laboratórna príručka (Cold Spring Harbor Press, 2. vyd., 1989) (zaradené tu ako odkaz v jeho celosti na všetky účely). K iným metódam používaným na transformáciu cicavčích buniek patrí použitie polybrénu, protoplastová fúzia, lipozómy, elektroporácia a mikroinjekcia (pozri vo všeobecnosti Sambrook a kol., vyššie). Na prípravu transgenických zvierat sa môžu transgéны mikroinjektovať do oplodnených oocytov alebo sa môžu zaviesť do genómu embryonických kmeňových buniek, a jadrá takýchto buniek preniesť do enukleovaných oocytov.

Keď sa ťažký a ľahký reťazec klonujú na samostatných expresných vektorech, tieto vektory sa kotransfektujú, aby sa tak dosiahla expresia a vytvorenie intaktného imunoglobulínu. Takto exprimované úplné protilátky, ich diméry, individuálne ľahké a ťažké reťazce alebo iné imunoglobulínové formy podľa tohto vynálezu sa môžu prečistiť pomocou štandardných metód v tomto odbore, ku ktorým patrí zrážanie síranom amónnym, afinitné stĺpce, stĺpcová chromatografia, čistenie pomocou HPLC, gélová elektroforéza a podobne (pozri vo všeobecnosti Scopes, *Protein Purification* (Čistenie proteínov) (Springer Verlag, N.Y., (1982)). Pre farmakologické použitie sú výhodné v zásade čisté imunoglobulíny aspoň asi z 90 až 95 % homogenitou a najvýhodnejšie s 98 až 99 % a väčšou homogenitou.

### 7. Fragmenty protilátok

Do rámca tohto vynálezu sa uvažuje aj s fragmentami protilátok. V jednom praktickom uskutočnení sa opisujú fragmenty nečlovečích, chimérických a/alebo ľudských protilátok. V inom praktickom uskutočnení sa opisujú fragmenty humanizovaných protilátok. Tieto fragmenty obvykle prejavujú špecifickú väzbu k antigénu s afinitou aspoň  $10^7$  a obvyklejšie  $10^8$  alebo  $10^9 \text{ M}^{-1}$ . K fragmentom humanizovaných protilátok patria samostatné ťažké reťazce, ľahké reťazce Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc a Fv. Fragmenty sa pripravujú rekombinantnými DNA technikami alebo enzymatickou alebo chemickou separáciou intaktných imunoglobulínov.

### 8. Skúšanie protilátok na terapeutickú účinnosť vo zvieracích modeloch

Každému jedincovi v skupine 7-9-mesačných PDAPP myší sa injekčne podalo 0,5 mg polyklonálnej anti-A $\beta$  alebo špecifickej anti-A $\beta$  monoklonálnej protilátky v PBS. Všetky preparáty protilátok sa prečistili, aby mali nízke hladiny endotoxínov. Monoklonály sa môžu pripraviť proti fragmentu injekčným podaním fragmentu alebo myšej dlhej formy A $\beta$ , prípravou hybridómov a skríningom hybridómov na protilátky, ktoré sa špecificky viažu na požadovaný fragment A $\beta$  bez viazania sa na iné neprekrývajúce sa fragmenty A $\beta$ .

Myši sa injikovali intraperitoneálne podľa potreby počas 4 mesiacov, aby sa udržiavala koncentrácia cirkulujúcej protilátky meraná titrom ELISA väčšia než 1/1000, definovaným pomocou ELISA k A $\beta$ 42 alebo inému imunogénu. Titre sa sledovali a myši sa utratili po uplynutí 6 mesiacov injekciou. Post mortem sa urobila histochemia, hladiny A $\beta$  a toxikológia. V každej skupine sa použilo 10 myší.

### 9. Skríning protilátok na clearingovú aktivitu

Vynález tiež poskytuje metódy skríningu protilátky na aktivitu v odstraňovaní amyloidového depozitu alebo nejakého iného antigénu alebo súvisiacej biologickej entity, pre ktorú sa clearingová aktivita vyžaduje. Na skríning aktivity proti amyloidovému depozitu sa privedie do kontaktu vzorka tkaniva z mozgu pacienta s Alzheimerovou chorobou alebo zvieracieho modelu, ktorý má charakteristické znaky Alzheimerovej patológie s fagocytickými bunkami nesúcimi Fc receptor, ako sú mikrogliálne bunky, a skúšaná protilátka v médiu *in vitro*. Fagocytické bunky môžu byť primárnou kultúrou alebo bunkovou líniou, ako sú BV-2, C8-B4 alebo THP-1. V niektorých metódach sa zložky miešajú na mikroskopickom sklíčku, aby sa uľahčilo mikroskopické sledovanie. V niektorých metódach sa viaceré reakcie vykonávajú paralelne v jamkách mikrotitracej misky. V takomto prevedení sa do jednotlivých jamiek môžu uložiť jednotlivé miniatúrne mikroskopické sklíčka, alebo sa môže použiť nemikrosko-

pické prevedenie, ako je detekcia A $\beta$  metódou ELISA. Výhodne sa urobí séria meraní množstva amyloidovej usadeniny v reakčnej zmesi *in vitro*, začínajúc od hodnoty základnej línie predtým, ako sa reakcia rozbehla, a v jednej alebo dvoch hodnotách počas reakcie. Antigén sa môže detegovať farbením, napríklad fluorescenčne označenou protilátkou k A $\beta$  alebo inej zložke amyloidových plakov. Protilátka použitá na farbenie môže, ale nemusí byť tá istá ako protilátka skúšaná na clearingovú aktivitu. Zníženie oproti základnej línii počas reakcie amyloidových usadenín naznačuje, že skúšaná protilátka má clearingovú aktivitu. Takéto látky sa pravdepodobne dajú použiť na prevenciu alebo liečbu Alzheimerovej choroby a iných amyloidogénnych chorôb.

Analogické metódy sa môžu použiť na skrining protilátok na aktivitu v clearingu iných typov biologických entít. Táto skúška sa môže použiť na detekciu clearingovej aktivity proti prakticky každému druhu biologickej entity. Biologická entita hrá obvykle určitú rolu v ochorení ľudí alebo zvierat. Biologická entita môže byť vo forme vzorky tkaniva alebo v izolovanej forme. Ak ide o vzorku tkaniva, potom táto vzorka tkaniva je výhodne nefixovaná, aby sa umožnil ľahký prístup k zložkám tejto vzorky tkaniva a aby sa predišlo náhodnému porušeniu konformácie zložiek pri fixácii. K príkladom vzoriek tkaniva, ktoré sa môžu skúšať v tejto skúške, patrí kancerózne tkanivo, prekancerózne tkanivo, tkanivo obsahujúce benígne novotvary, ako sú bradavice alebo moly, tkanivo obsahujúce patologické matrice medzi bunkami (napr. fibrinózna perikarditída), tkanivo obsahujúce aberačné antigény a jazvové tkanivo. Príkladmi izolovaných biologických entít, ktoré sa môžu použiť, sú A $\beta$ , vírusové antigény alebo vírusy, proteoglykány, antigény iných patologických mikroorganizmov, tumorové antigény a adhézne molekuly. Takéto antigény sa môžu okrem iných spôsobov získať z prírodných zdrojov, rekombinantnou expresiou alebo chemickou syntézou. Vzorka tkaniva alebo izolovaná biologická entita sa privedú do kontaktu s fagocytickými bunkami nesúcimi Fc receptory, ako sú monocyty alebo mikrogliálne bunky, a skúšaná protilátka v nejakom médiu. Protilátka sa môže smerovať na skúšanú biologickú entitu alebo na antigén súvisiaci s entitou. V druhom prípade sa objekt testuje, či je biologická entita nepriamo podlieha fagocytóze antigénom. Obyčajne, ale nie nevyhnutne, je protilátka s biologickou entitou (niekedy s súvisiacej antigénom) navzájom v kontakte pred

pridaním fagocytických buniek. Koncentrácia biologickej entity a/alebo súvisiaceho antigénu ostávajúceho v médiu, ak je prítomné, sa potom sleduje. Zníženie množstva alebo koncentrácie antigénu alebo súvisiacej biologickej entity v médiu naznačuje, že protilátka vyvoláva clearingovú odozvu proti antigénu a/alebo súvisiacej biologickej entite spoločne s fagocytickými bunkami (pozri napr. príklad IV).

### B. Nukleová kyselina kódujúca imunologické a terapeutické činidlo

Imunitné odozvy voči amyloidovým depozitom sa môžu tiež vyvolať podaním nukleových kyselín kódujúcich protilátky a ich reťazce používané pri pasívnej imunizácii. Takýmito nukleovými kyselinami môže byť DNA alebo RNA. Segment nukleovej kyseliny kódujúci imunogén je obvykle spojený k regulačnými prvkami, ako sú promótor a enhancer, ktoré umožňujú expresiu DNA segmentu v predpokladaných terčových bunkách pacienta. Na expresiu v krvných bunkách, ako je to žiaduce na indukciu imunitnej odozvy, elementy promótoru a enhancera z génov ľahkého a ťažkého reťazca imunoglobulínu alebo hlavný intermediárny počiatočný promótor a enhancer CMV sú vhodné na priamu expresiu. Spojené regulačné elementy a kódovacie sekvencie sa často klonujú do vektora. Na zavedenie dvojreťazcových protilátok sa môžu klonovať dva reťazce v tom istom alebo v samostatných vektoroch.

Existuje rad vírusových vektorových systémov zahŕňajúci retrovírusové systémy (pozri napr. Lawrie a Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109 (1993)); adenovírusové vektory (pozri napr. Bett a kol., *J. Virol.* 67:5911 (1993)); adeno-asociované vírusové vektory (pozri napr. Zhou a kol., *J. Exp. Med.* 179:1867 (1994)), vírusové vektory z čeľade pox zahŕňajúce vírus vaccinia a vírusy opičích kiahní, vírusové vektory z rodu alphavírus, ako sú vektory odvodené z vírusov Sindbis a Semliki Forest (pozri napr. Dubensky a kol., *J. Virol.* 70:508 (1996)), vírus venezuelskej konskej encefalitídy (pozri Johnston a kol., US 5,643,576 a rabdovírusy, ako je vírus vezikulárnej stomatitídy (pozri Rose, WO 96/34625), a papilomavírusy (Ohe a kol., *Human Gene Therapy* 6:325 (1995); Woo a kol., WO 94/12629 a Xiao a Brandsma, *Nucleic Acids Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

DNA kódujúca imunogén alebo vektor obsahujúci imunogén sa môže obaliť do lipozómov. Vhodné lipidy a príbuzné analógy sú opísané v Eppstein a kol., US 5,208,036, Felgner a kol., US 5,264,618, Rose, US 5,279,833 a Epanand a kol., US 5,283,185. Vektory a DNA kódujúce imunogén sa môžu adsorbovať na povrch alebo asociovať s partikulovými nosičmi, k príkladom ktorých patria polyméry polymetylmetakrylátu a polylaktidy a laktid-glykolidový kopolymér, pozri napr. McGee a kol., *J. Micro Encap.* (1996).

Vektory génovej terapie alebo nahé polypeptidy (napr. DNA) sa môžu zavádzať *in vivo* podávaním jednotlivému pacientovi, obvykle systémovou cestou (napr. intravenózne, intraperitoneálne, nazálne, gastricky, intradermálne, intramuskulárne, subdermálne alebo intrakraniálnou infúziou) alebo topic-kou cestou (pozri napr. Anderson a kol., US 5,399,346). Výraz „nahý polynukleoid“ označuje polynukleotid, ktorý nie je komplexovaný koloidnými materiálmi. Nahé polynukleotidy sa niekedy klonujú do plazmidového vektora. Takéto vektory môžu ďalej zahŕňať facilitačné činidlá, ako je bupivacín (Attarda a kol., US 5,593,970). DNA sa tiež môže podať pomocou génovej pušky. Pozri Xia a Brandsma, vyššie. DNA kódujúca imunogén sa vyzráža na povrchu mikroskopických kovových guľčiek. Mikroprojektily sa urýchlia rázovou vlnou alebo expandujúcim plynným héliom a prenikajú tkanivami do hĺbky niekoľkých vrstiev buniek. Napríklad je vhodný The Accel™ Gene Delivery Device vyrobený firmou Agacetus Inc., Middleton, WI. Nahá DNA môže tiež preniknúť cez kožu do krvného riečiska jednoducho nanosením škvŕny DNA na kožu spojeným s chemickým alebo mechanickým podráždením (pozri Howell a kol., WO 95/05853).

V ďalších variantoch sa môžu vektory kódujúce imunogény zaviesť do buniek *ex vivo*, ako bunky implantované individuálnemu pacientovi (napr. lymfocyty, aspiráty kostnej drene, tkanivové biopsie) alebo ako univerzálne donor-né hematopoetické kmeňové bunky, po čom nasleduje reimplantácia týchto buniek pacientovi, obyčajne po selekcii buniek, ktoré majú zavedený vektor.

## II. Profylaktické a terapeutické metódy

Tento vynález je zameraný okrem iného na liečbu Alzheimerovej choroby a iných amyloidogénnych ochorení podávaním terapeutických imunologických činidiel (napr. humanizovaných imunoglobulínov) k špecifickým epitopom v A $\beta$  pacientovi za podmienok, ktoré vyvolajú u pacienta priaznivú terapeutickú odozvu (napr. indukciu fagocytózy A $\beta$ , redukciu množstva plakov, inhibíciu tvorby plakov, obmedzenie neuritickej dystrofie, zlepšenie kognitívnej funkcie a/alebo zvrátenie kognitívneho úpadku, jeho liečbu alebo prevenciu u pacienta), napríklad na prevenciu alebo liečbu amyloidogénnej choroby. Vynález je tiež zameraný na použitie opísaných imunologických činidiel (napr. humanizovaných imunoglobulínov) vo výrobe medikamentu na liečbu alebo prevenciu amyloidogénnej choroby.

Výraz „liečba“, ako sa tu používa, je definovaný ako aplikácia alebo podávanie terapeutického činidla pacientovi, alebo aplikácia alebo podávanie terapeutického činidla izolovanému tkanivu alebo bunkovej línii z pacienta, ktorý má chorobu, symptóm choroby alebo predispozíciu k chorobe, s účelom vyliečiť, zmierniť, upraviť, uzdraviť, zlepšiť alebo ovplyvniť chorobu, symptómy choroby alebo predispozíciu k chorobe alebo aby sa z nej zotavil.

Jednou stránkou vynálezu je, že poskytuje metódy prevencie alebo liečby ochorenia súvisiaceho s usadeninami A $\beta$  amyloidov v mozgu pacienta. K takýmto ochoreniam patrí Alzheimerova choroba, Downov syndróm a kognitívna porucha. Posledne menované ochorenie sa môže vyskytovať s inými charakteristikami amyloidogénnej choroby alebo bez nich. Niektoré metódy tohto vynálezu sú spojené s podávaním účinnej dávky protilátky pacientovi, ktorá sa špecificky viaže na zložku amyloidového depozitu. Takéto metódy sú zvlášť užitočné na prevenciu alebo liečbu Alzheimerovej choroby u ľudských pacientov. Ukážkové metódy sú spojené s podávaním účinnej dávky protilátky, ktorá sa viaže na A $\beta$ . Výhodné metódy sú spojené s podávaním účinnej dávky protilátky, ktorá sa špecificky viaže na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-10, napríklad protilátky, ktoré sa špecificky viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-4, protilátky, ktoré sa špecificky viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-5, protilátky, ktoré sa špecificky viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-6, protilátky, ktoré sa špecificky viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-7, alebo protilátky, ktoré sa



špecificky viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 3-7. Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že predstavuje podávanie protilátok, ktoré sa viažu na epitop obsahujúci voľný N-koncový zvyšok A $\beta$ . Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že predstavuje podávanie protilátok, ktoré sa viažu na epitop v rámci A $\beta$  zvyškov 1-10, kde A $\beta$  zvyšok 1 a/alebo zvyšok 7 je kyselina asparágová. Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že predstavuje podávanie protilátok, ktoré sa špecificky viažu na A $\beta$  peptid bez viazania na amyloidový prekursorový proteín plnej dĺžky (APP). Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že izotyp protilátky je ľudský IgG1.

Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že predstavuje podávanie protilátok, ktoré sa viažu na amyloidový depozit v pacientovi a vyvolajú clearingovú odozvu proti amyloidovému depozitu. Takáto clearingová odozva sa môže realizovať fagocytózou sprostredkovanou Fc receptorom.

Terapeutické činidlá tohto vynálezu obvykle v zásade neobsahujú nežiaduce nečistoty. To znamená, že činidlo má obvykle čistotu aspoň asi 50 hmotnostných % (w/w), a v zásade neobsahuje interferujúce proteíny a nečistoty. Niekedy majú činidlá čistotu aspoň asi 80 % w/w a výhodnejšie aspoň 90 alebo asi 95 % w/w. Pomocou bežných techník čistenia proteínov sa však môžu získať homogénne peptidy s čistotou aspoň 99 % w/w.

Tieto metódy sa môžu použiť u asymptomatických pacientov aj u pacientov prejavujúcich symptómy choroby. Protilátky používané v takýchto metódach môžu byť humánne, humanizované, chimérické alebo nehumánne protilátky alebo ich fragmenty (napr. fragmenty viažuce antigén) a môžu byť monoklonálne alebo polyklonálne, ako sa tu opisuje. Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že vynález predstavuje podávanie protilátok pripravených z človeka imunizovaného peptidom A $\beta$ , kde človekom môže byť pacient, ktorý sa má liečiť protilátkou.

Ešte ďalšou stránkou vynálezu je, že predstavuje podávanie protilátky s farmaceutickým nosičom ako farmaceutickej kompozície. Protilátka sa môže tiež podávať pacientovi podávaním nukleotidu kódujúceho aspoň jeden reťazec protilátky. Polynukleotid sa exprimuje, aby produkoval reťazec protilátky u pa-

cienta. Polynukleotid prípadne kóduje ťažký a ľahký reťazec protilátky. Polynukleotid sa exprimuje, aby produkoval ťažký a ľahký reťazec u pacienta. V ukázkových praktických uskutočneniach sa u pacienta sleduje hladina podávanej protilátky v krvi pacienta.

Vynález tak spĺňa dlhotrvajúcu potrebu terapeutických režimov prevencie alebo liečby neuropatológie a, u niektorých pacientov, kognitívnej poruchy súvisiacej s Alzheimerovou chorobou.

#### A. Pacienti vhodní na liečbu

K pacientom vhodným na liečbu patria jednotlivci s rizikom ochorenia, ale neprejavujúci symptómy, ako aj pacienti, ktorí už majú symptómy. V prípade Alzheimerovej choroby je prakticky ktokoľvek v nebezpečenstve ochorenia na Alzheimerovu chorobu, ak žije dostatočne dlho. Tieto metódy sa preto môžu aplikovať profylakticky na všeobecnú populáciu bez potreby zhodnotenia nebezpečenstva pre pacienta. Tieto metódy sú užitočné najmä pre jednotlivcov, ktorí majú známe genetické riziko Alzheimerovej choroby. K takýmto jednotlivcom patria tí, ktorí majú príbuzných, ktorí trpeli touto chorobou, a tí, ktorých nebezpečenstvo sa určí analýzou genetických alebo biochemických markerov. Genetické markery rizika Alzheimerovej choroby zahŕňajú mutácie v APP géne, najmä mutácie v polohe 717 a polohách 670 a 671 označovaných ako Hardyho, resp. Swedishove mutácie (pozri Hardy, vyššie). Iné markery rizika sú mutácie v presenilínových génoch PS1 a PS2, a ApoE4, rodinná história AD, hypercholesterolémia alebo ateroskleróza. Jednotlivci v súčasnosti trpiaci Alzheimerovou chorobou sa dajú poznať podľa charakteristickej demencie, ako aj prítomnosťou rizikových faktorov opísaných vyššie. Okrem toho je k dispozícii veľký počet diagnostických testov na identifikáciu jednotlivcov, ktorí majú AD. Tieto testy zahŕňajú meranie hladiny tau a A $\beta$ 42 v likvore. Zvýšené hladiny tau a znížené hladiny A $\beta$ 42 znamenajú prítomnosť AD. Jednotlivci trpiaci Alzheimerovou chorobou sa môžu tiež diagnostikovať kritériami ADRDA, ako sa diskutuje v časti príkladov.

U asymptomatických pacientov sa môže začať liečba v ľubovoľnom veku (napr. 10, 20, 30 rokov). Obyčajne však nie je potrebné začať s liečbou skôr,

než pacient dosiahne 40, 50, 60 alebo 70 rokov. Liečba obvykle pozostáva z viacnásobných dávok podávaných v určitom období. Liečba sa môže sledovať skúšaním hladín protilátok v určitom období. Ak odozva klesá, indikuje sa posilňovacia dávka. V prípade potenciálnych pacientov s Downovým syndrómom sa môže liečba začať prenatálne podávaním terapeutického činidla matke alebo krátko po narodení.

### B. Liečebné režimy a dávkovanie

V profylaktických aplikáciách sa podávajú farmaceutické kompozície alebo medikamenty pacientovi náchylnému na Alzheimerovu chorobu alebo inak pri riziku Alzheimerovej choroby v množstve dostatočnom na odstránenie alebo zníženie rizika, zníženie závažnosti ochorenia, oddialenie nástupu choroby, zahŕňajúc biochemické, histologické a/alebo behaviorálne symptómy ochorenia, jeho komplikácie a prechodné patologické fenotypy prítomné počas rozvoja ochorenia. V terapeutických aplikáciách sa podávajú kompozície alebo medikamenty pacientom s podozrením na alebo už trpiacim takouto chorobou v množstve dostatočnom na vyliečenie alebo aspoň sčasti na zmiernenie symptómov choroby (biochemické, histologické a/alebo behaviorálne), zahŕňajúc jej komplikácie a prechodné patologické fenotypy vo vývoji choroby.

V niektorých metódach podávanie činidla znižuje alebo odstraňuje myokognitívne poruchy u pacientov, ktoré sa ešte nevyvinuli do charakteristickej Alzheimerovej patológie. Množstvo primerané na dosiahnutie terapeutického alebo profylaktického účinku sa definuje ako terapeuticky alebo profylakticky účinná dávka. V profylaktickom a terapeutickom režime sa činidlá obvykle podávajú v niekoľkých dávkach, až kým sa dosiahne dostatočná imunitná odozva. Výraz „imunitná odozva“ alebo „imunologická odozva“ zahŕňa vývoj humorálnej (sprostredkovanej protilátkou) a/alebo celulárnej (sprostredkovanej T bunkami špecifickými pre antigén alebo produktami ich sekrécie) odozvy smerovanej proti antigénu v subjekte príjemcu. Takáto odozva môže byť aktívnou odozvou, t.j. indukovaná podávaním imunogénu, alebo pasívnou odozvou, t.j. vy-

volanou podávaním imunoglobulínu alebo protilátky alebo primárne imunizovaných T buniek.

„Imunogénne činidlo“ alebo „imunogén“ je schopný indukovať imunologickú odozvu proti sebe samému pri podávaní cicavcovi, prípadne spolu s adjuvantom. Imunitná odozva sa obvykle sleduje a ak imunitná odozva začne klesať, aplikujú sa opakované dávky.

Efektívne dávkovanie kompozícií podľa tohto vynálezu na liečbu vyššie opísaných stavov sa mení v závislosti od množstva rozličných faktorov, ktoré zahŕňajú spôsob podávania, cieľové miesto, fyziologický stav pacienta, či je pacient človek alebo zviera, iné podávané medikácie, a či ide o profylaxiu alebo terapiu. Pacientom je obvykle človek, ale nečlovečie cicavce, zahŕňajúc transgenické cicavce, sa môžu tiež liečiť. Liečebné dávky je potrebné nastaviť tak, aby sa optimalizovala bezpečnosť a účinnosť.

Na pasívnu imunizáciu s protilátkou je dávkovanie v rozsahu asi od 0,0001 do 100 mg/kg, obvyklejšie 0,01 až 5 mg/kg telesnej hmotnosti hostiteľa. Ukázkovými dávkovaniami môže byť 1 mg/kg telesnej hmotnosti alebo 10 mg/kg telesnej hmotnosti alebo v rozsahu 1-10 mg/kg, výhodne aspoň 1 mg/kg. Subjektom sa môžu podať takéto dávky denne alebo obdeň, týždenne alebo podľa nejakého iného rozvrhu určeného empirickou analýzou. Ukážková liečba vyžaduje podávanie vo viacerých dávkach počas dlhšej periódy, napríklad počas šiestich mesiacov. Ďalšie ukážkové liečebné režimy vyžadujú podávanie raz za dva týždne alebo raz za mesiac alebo raz za 3 až 6 mesiacov. Ukážkové dávkové rozvrhy sú 1-10 mg/kg alebo 15 mg/kg každý deň, 30 mg/kg obdeň alebo 60 mg/kg týždenne. V niektorých metódach sa súčasne podávajú dve alebo viac monoklonálnych protilátok s rozličnými väzbovými špecificitami a v týchto prípadoch dávkovanie každej podávanej protilátky spadá do uvedených rozsahov.

Protilátky sa obvykle podávajú viacdávkovým spôsobom. Intervaly medzi jednotlivými dávkami môžu byť týždňové, mesačné alebo ročné. Intervaly môžu byť tiež nepravidelné podľa údajov merania krvných hladín protilátok k A $\beta$  u pacienta. Pri niektorých metódach sa dávka nastaví tak, aby sa dosiahla kon-

centrácia protilátky v plazme 1-1000  $\mu\text{g/ml}$  a v niektorých metódach 25-300  $\mu\text{g/ml}$ . Protilátka sa môže tiež podávať vo forme prípravku postupne uvoľňujúceho liečivo a v takomto prípade sa vyžaduje menej časté podávanie. Dávkovanie a frekvencia podávania sa mení v závislosti na polčase života protilátky v pacientovi. Vo všeobecnosti najdlhší polčas života majú ľudské protilátky, nasledujú humanizované protilátky, chimérické protilátky a nečlovečie protilátky.

Dávkovanie a frekvencia podávania sa môžu meniť v závislosti od toho, či je aplikácia profylaktická alebo terapeutická. V profylaktických aplikáciách sa kompozície obsahujúce uvedené protilátky alebo ich zmes podávajú pacientovi, ktorý ešte nie v chorobnom stave, aby sa zvýšila pacientova odolnosť. Takéto množstvo sa definuje ako „profylakticky účinná dávka“. Pri takomto použití závisia presné množstvá na stave pacientovho zdravia a celkovej imunity, ale vo všeobecnosti sú v rozsahu 0,1 až 25 mg na dávku, najmä 0,5 až 2,5 mg na dávku. Pomerne nízka dávka sa podáva v pomerne zriedkavých intervaloch počas dlhšieho obdobia. U niektorých pacientov pokračuje aplikácia po celý zvyšok života.

Pri terapeutických aplikáciách sa niekedy vyžadujú pomerne vysoké dávky (napr. asi od 1 do 200 mg protilátky na dávku, pričom bežnejšie používané dávky sú od 5 do 25 mg) v pomerne krátkych intervaloch, kým sa progresia choroby zníži alebo zastaví, a výhodne dovtedy, až sa u pacienta prejaví čiastočné alebo úplné odstránenie symptómov choroby. Ďalej môže pacient dostávať dávky v profylaktickom režime.

Dávky nukleových kyselín kódujúcich protilátky sú v rozsahu asi od 10 ng do 1 g, 100 ng až 100 mg, 1  $\mu\text{g}$  až 10 mg alebo 30-300  $\mu\text{g}$  DNA na pacienta. Dávky pre infekčné vírusové vektory sa menia od 10 do 100 alebo viac viriónov na dávku.

Terapeutické činidlá na profylaktickú a/alebo terapeutickú aplikáciu sa môžu podávať parenterálnym, topickým, intravenóznym, orálnym, subkutánnym, intraarteriálnym, intrakraniálnym, intraperitoneálnym, intranazálnym alebo intramuskulárnym spôsobom. Najobvyklejšou cestou podávania imunogénneho činidla je subkutánna, hoci iné cesty môžu byť rovnako účinné. Ďalšou

najobvyklejšou cestou je intramuskulárna injekcia. Tento spôsob injekcie sa najbežnejšie vykoná do svalov ramena alebo nohy. V niektorých metódach sa činidlá vstrekujú priamo do konkrétneho tkaniva, v ktorom sa depozity nahromaždili, napríklad intrakraniálnou injekciou. Na podávanie protilátky sú výhodné intramuskulárna injekcia alebo intravenózna infúzia. V niektorých metódach sa konkrétne terapeutické protilátky vstrekujú priamo do lebky. V niektorých metódach sa protilátky podávajú ako prípravok alebo zariadenie postupne uvoľňujúci liečivo, ako je zariadenie Medipad™.

Činidlá tohto vynálezu sa môžu prípadne podávať v kombinácii s inými činidlami, ktoré sú aspoň čiastočne účinné pri liečbe amyloidogénnych chorôb. V prípade Alzheimerovho a Downovho syndrómu, pri ktorých sa amyloidové depozity vyskytujú v mozgu, sa činidlá tohto vynálezu môžu tiež podávať súčasne s inými činidlami, ktoré zlepšujú prechod činidiel tohto vynálezu cez hematoencefalitickú bariéru.

### C. Farmaceutické kompozície

Činidlá tohto vynálezu sa často podávajú ako farmaceutické kompozície obsahujúce aktívne terapeutické činidlo a celú škálu iných farmaceuticky prijateľných zložiek. Pozri *Remington's Pharmaceutical Science (Remingtonova farmaceutická veda)* (15. vyd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). Výhodná forma závisí na zamýšľanom spôsobe podávania a terapeutickej aplikácii. Kompozície môžu tiež obsahovať, v závislosti na požadovanom zložení, farmaceuticky prijateľné, netoxické nosiče a riedidlá, ktoré sú definované ako vehikulá bežne používané pri výrobe farmaceutických kompozícií určených na podávanie zvieratám a ľuďom. Riedidlo sa vyberá tak, aby neovplyvňovalo biologickú aktivitu tejto kombinácie. Príkladmi takýchto riedidiel sú voda, fyziologický solný roztok tlmený fosfátom, Ringerov roztok, dextrózový roztok a Hankov roztok. Okrem toho farmaceutická kompozícia alebo zmes môže tiež obsahovať iné nosiče, adjuvanty alebo netoxické, neterapeutické, neimunogénne stabilizátory a podobne.

Farmaceutické kompozície môžu tiež obsahovať veľké, pomaly metabolizujúce makromolekuly, ako sú proteíny, polysacharidy, ako je chitosan, kyseliny polymliečne, kyseliny polyglykolové a kopolyméry (ako je sefaróza funkcionalizovaná latexom(TM), agaróza, celulóza a podobne), polymérne aminokyseliny, kopolyméry aminokyselín a lipidové agregáty (ako sú olejové kvapôčky alebo lipozómy). Tieto nosiče môžu tiež pôsobiť ako imunostimulujúce činidlá (t.j. adjuvanty).

Na parenterálne podávanie sa činidlá tohto vynálezu môžu podávať ako injektabilné dávky roztoku alebo suspenzie látky vo fyziologicky prijateľnom riedidle s farmaceutickým nosičom, ktorým môže byť sterilná kvapalina, ako je voda, oleje, soľný roztok, glycerol alebo etanol. Okrem toho môžu byť prítomné v kompozíciách pomocné látky, ako sú zvlhčujúce alebo emulzifikujúce činidlá, povrchovo aktívne látky, látky tlmiace pH a podobne. Inými zložkami farmaceutických kompozícií sú minerálny, živočíšny, rastlinný alebo pôvodom syntetický olej, napríklad arašidový olej, sójový olej a minerálny olej. Výhodnými kvapalnými nosičmi sú vo všeobecnosti glykoly, ako je propylénglykol a polyetylénglykol, najmä pre injektabilné roztoky. Protilátky sa môžu podávať vo forme depotnej injekcie alebo implantátového prípravku, ktoré sa môžu pripraviť takým spôsobom, aby sa umožnilo postupné uvoľňovanie aktívnej zložky. Ukážková príklad obsahuje monoklonálnu protilátku s koncentráciou 5 mg/ml v zmesi s vodným tlmivým roztokom obsahujúcim 50 mM L-histidínu, 150 mM NaCl a s pH nastaveným na 6,0 pomocou HCl.

Kompozície sa pripravujú v injektabilnej forme, buď ako kvapalné roztoky alebo suspenzie; môžu sa tiež pripraviť tuhé formy vhodné na rozpustenie alebo suspendovanie v kvapalnom vehikule pred injekčným podaním. Preparát sa tiež môže emulzifikovať alebo obaliť v lipozómoch alebo mikročasticách, ako je polylaktid, polyglykolid alebo kopolymér na zvýšenie adjuvantného účinku, ako sa diskutovalo vyššie (pozri Langer, *Science* 249:1527 (1990) a Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97 (1997)). Činidlá tohto vynálezu sa môžu podávať vo forme depotnej injekcie alebo implantátového prípravku, ktoré sa môžu pripraviť takým spôsobom, aby sa umožnilo postupné alebo pulzačné uvoľňovanie aktívnej zložky.

Ďalšie zmesi vhodné na iné spôsoby podávania zahŕňajú orálne, intranasálne alebo pulmonárne zmesi, čapíky a transdermálne aplikácie. K spojivám a nosičom pre čapíky patria napríklad polyalkylénglykoly alebo triglyceridy; takéto čapíky sa môžu pripraviť zo zmesí obsahujúcich aktívnu zložku v rozsahu 0,5 % až 10 %, výhodne 1 % až 2 %. Orálne zmesi obsahujú excipienty, ako sú manitol, laktóza, škrob, stearát horečnatý, sodný sacharín, celulóza a uhličitan horečnatý s čistotou farmaceutického stupňa. Tieto kompozície majú formu roztokov, suspenzií, tabliet, piluliek, kapsúl, prípravkov postupne uvoľňujúcich liečivo alebo práškov a obsahujú 10 % až 95 % aktívnej zložky, výhodne 25 % až 70 %.

Topická aplikácia môže slúžiť na transdermálne alebo intradermálne podanie. Topické podanie sa môže uľahčiť súčasným podávaním činidla s toxínom cholery alebo detoxifikovanými derivátmi alebo ich podjednotkami alebo inými podobnými bakteriálnymi toxínmi (pozri Glenn a kol., *Nature* 391, 851 (1998)). Súčasné podávanie sa môže dosiahnuť použitím zložiek ako zmesi alebo ako spojených molekúl získaných chemickým zosieťovaním alebo expresiou ako fúzny proteín.

Transdermálne podanie sa môže tiež dosiahnuť použitím kožnej cesty alebo pomocou transferozómov (Paul a kol., *Eur. J. Immunol.* 25:3521 (1995); Cevc a kol., *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15 (1998)).

### III. Sledovanie priebehu liečby

Vynález poskytuje metódy sledovania liečby u pacienta trpiaceho Alzheimerovou chorobou alebo náchylného na ňu, t.j. na sledovanie priebehu liečby poskytovanej pacientovi. Táto metóda sa môže použiť na sledovanie terapeutickú liečby u symptomatických pacientov a na profylaktickú aplikáciu u asymptomatických pacientov. Tieto metódy sú hlavne použiteľné na sledovanie pasívnej imunizácie (napr. meranie hladiny podanej protilátky).

Niektoré metódy vyžadujú určenie hodnoty základnej línie, napríklad hladiny alebo profilu protilátky u pacienta pred podaním dávky činidla, a po-



rovnanie tejto hodnoty s hodnotou pre profil alebo hladinu po liečbe. Významné zvýšenie (t.j. väčšie než obvyklá hranica experimentálnej chyby v opakovaných meraniach rovnakej vzorky, vyjadrenej ako jedna smerodajná odchýlka priemeru takých meraní) hodnoty hladiny alebo profilu signalizuje kladný výsledok liečby (t.j. podanie činidla dosiahlo požadovanú odozvu). Ak sa hodnota imunitnej odozvy významne nezmení alebo sa zníži, znamená to negatívny výsledok.

V iných metódach sa stanoví pre kontrolnú populáciu kontrolná hodnota (t.j. priemer a smerodajná odchýlka). Jednotlivci v kontrolnej populácii obvykle neboli predtým liečení. Merané hodnoty hladiny alebo profilu u pacienta po podaní terapeutického činidla sa potom môžu porovnať s kontrolnou hodnotou. Významné zvýšenie voči kontrolnej hodnote (napr. väčšie než jedna smerodajná odchýlka priemeru) signalizuje pozitívny alebo dostatočný výsledok liečby. Neprítomnosť významného zvýšenia alebo zníženie signalizuje negatívny alebo nedostatočný výsledok liečby. Podávanie činidla vo všeobecnosti pokračuje dovtedy, kým sa hodnota oproti kontrolnej hodnote zvyšuje. Ako predtým, dosiahnutie plató voči kontrolnej hodnote je známkou, že poskytovanie liečby sa môže prerušiť alebo sa môžu znížiť dávky a/alebo frekvencia užívania.

V iných metódach sa určí kontrolná hodnota hladiny alebo profilu (napr. priemer a smerodajná odchýlka) z kontrolnej populácie jednotlivcov, ktorí absolvovali liečbu terapeutickým činidlom a ktorých hladiny alebo profily dosiahli plató v odozve na liečbu. Namerané hodnoty hladín alebo profilov u pacienta sa porovnávajú s kontrolnou hodnotou. Ak nameraná hodnota u pacienta nie je významne rozdielna (napr. väčšia než smerodajná odchýlka) od kontrolnej hodnoty, môže sa liečba prerušiť. Ak hladina u pacienta je významne pod kontrolnou hodnotou, pokračovanie v podávaní činidla je oprávnené. Ak hodnota u pacienta zostáva pod kontrolnou hodnotou, potom sa môže indikovať zmena liečby.

V iných metódach sa sledujú u pacienta, ktorý nie je v súčasnosti liečený, ale podstúpil v minulosti liečebnú kúru, hladiny alebo profily protilátok, aby sa určilo, či je potrebné obnoviť liečbu. Nameraná hodnota alebo profil u

pacienta sa môže porovnať s hodnotou dosiahnutou predtým u pacienta po predchádzajúcej liečebnej kúre. Významné zníženie voči predošlému meraniu (t.j. väčšie než obvyklá hranica chyby v opakovaných meraniach v rovnakej vzorke) naznačuje, že liečba sa môže znova začať. Hodnota nameraná u pacienta sa môže tiež porovnať s kontrolnou hodnotou (priemer plus smerodajná odchýlka) určenou v populácii pacientov po absolvovaní liečebnej kúry. Nameraná hodnota u pacienta sa môže tiež porovnať s kontrolnou hodnotou v populáciách profylakticky ošetrovaných pacientov, u ktorých sa naďalej neprejavujú symptómy choroby, alebo v populáciách terapeuticky ošetrovaných pacientov, u ktorých sa prejavilo zlepšenie charakteristik choroby. Vo všetkých týchto prípadoch významné zníženie voči kontrolnej hladine (t.j. väčšie než smerodajná odchýlka) znamená, že liečba by sa mala u pacienta obnoviť.

Vzorkou tkaniva na analýzu je obvykle krv, plazma, sérum, mukózna tekutina alebo likvor pacienta. Vzorka sa analyzuje napríklad na hladiny alebo profily protilátok k A $\beta$  peptidu, napr. hladiny alebo profily humanizovaných protilátok. Metódy ELISA na detekciu protilátok špecifických k A $\beta$  sú opísané v časti príkladov. V niektorých metódach sa určí hladina alebo profil podávanej protilátky pomocou clearingovej skúšky, napríklad vo fagocytóznej skúške *in vitro*, ako sa tu opisuje. V takých metódach sa vzorka tkaniva z vyšetrovaného pacienta privedie do styku s depozitmi amyloidu (napr. z PDAPP myši) a s fagocytickými bunkami nesúcimi Fc receptory. Potom sa pozoruje následné odstraňovanie depozitu amyloidu. Existencia alebo rozsah clearingovej odozvy poskytuje indikátor existencie a hladiny protilátok účinných na odstraňovanie A $\beta$  vo vzorke tkaniva vyšetrovaného pacienta.

Profil protilátky po pasívnej imunizácii obvykle ukazuje prechodný vrchol v koncentrácii protilátky, po ktorom nasleduje exponenciálny pokles. Bez ďalšieho dávkovania sa tento pokles v priebehu niekoľkých dní až mesiacov približuje k hodnotám pred liečbou, v závislosti od polčasu života podávanej protilátky. Napríklad polčas života niektorých ľudských protilátok je rádovo 20 dní.

V niektorých metódach sa urobí meranie základnej línie protilátky k A $\beta$  u pacienta pred poskytnutím liečby, druhé meranie sa urobí čoskoro po určení

najvyššej hladiny protilátky a jedno alebo viac ďalších meraní sa urobí v určitých časových intervaloch, aby sa sledoval pokles hladín protilátky. Keď hladina protilátky klesne k základnej línii alebo k stanovenému percentuálnemu podielu hodnoty vrchol mínus základná línia (napr. 50 %, 25 % alebo 10 %), podá sa ďalšia dávka protilátky. V niektorých metódach sa vrchol alebo následne merané hodnoty mínus pozadie porovnajú s referenčnými hodnotami predtým stanovenými tak, že tvoria prospešný profylaktický alebo terapeutický liečebný režim u iných pacientov. Ak namerané hodnoty protilátky sú významne nižšie než referenčná hladina (napr. menšie než priemer mínus jedna smerodajná odchýlka referenčnej hodnoty v populácii pacientov s priaznivým efektom liečby), indikuje sa podávanie ďalšej dávky protilátky.

K ďalším metódam patrí sledovanie nejakého fyziologického symptómu uznávaného v odbore (napr. fyzického alebo duševného symptómu) v priebehu liečby, na ktorý sa bežne spoliehajú výskumníci alebo lekári pri diagnostike alebo sledovaní amyloidogénnych ochorení (napr. Alzheimerovej choroby). Nieкто môže napríklad sledovať kognitívne poruchy. Tieto sú symptómami Alzheimerovej choroby a Downovho syndrómu, ale môžu sa tiež vyskytovať bez iných charakteristík niektorej z týchto chorôb. Napríklad kognitívna porucha sa môže sledovať určením pacientovho skóre v Mini-Mental State Exam (mini-duševnej štátnej skúške) podľa zvyklostí počas priebehu liečby.

### C. Súpravy

Vynález ďalej poskytuje súpravy na uskutočnenie sledovania vyššie opísaných metód. Takéto súpravy obvykle obsahujú činidlo, ktoré sa špecificky viaže na protilátku k A $\beta$ . Súprava môže tiež obsahovať značku. Na detekciu protilátok k A $\beta$  je značka obvykle vo forme označených anti-idiotypických protilátok. Na detekciu protilátok sa činidlo dodáva naviazané na tuhej fáze, ako sú jamky na mikrotitrovacej miske. Súpravy tiež obvykle obsahuje leták poskytujúci návod na použitie súpravy. Leták môže tiež obsahovať graf alebo iný režim korešpondencie korelujúci hladiny meranej značky s hladinami protilátok k A $\beta$ . Výraz leták označuje akýkoľvek písomný alebo zaznamenaný

materiál, ktorý je pripojený alebo ináč pribalený k súprave kedykoľvek počas jeho výroby, dopravy, predaja alebo použitia. Napríklad výraz leták zahŕňa reklamné letáčky a brožúrky, obalový materiál, návody, audio alebo video kazety počítačové disky, ako aj text vytlačený priamo na súprave.

Vynález tiež poskytuje diagnostické súpravy, napríklad výskumnú, detekčnú a/alebo diagnostickú súpravu (napr. na zobrazovanie *in vivo*). Takéto súpravy obvykle obsahujú protilátku na viazanie k epitopu A $\beta$ , výhodne v rámci zvyškov 1-10. Protilátka je výhodne značkováaná alebo je v súprave pribalené sekundárne značkovacie činidlo. Súprava výhodne obsahuje leták s návodom na vykonanie plánovanej aplikácie, napríklad na vykonanie zobrazovacej skúšky *in vivo*. Ukážkové protilátky sú tie, ktoré sú tu opísané.

#### D. Zobrazovanie *in vivo*

Vynález poskytuje metódy *in vivo* zobrazovania amyloidových depozitov u pacienta. Takéto metódy sú užitočné na diagnostiku alebo potvrdenie diagnózy Alzheimerovej choroby alebo náchylnosti na ňu. Napríklad sa tieto metódy môžu použiť u pacientov, u ktorých sa prejavujú symptómy demencie. Ak má pacient abnormálne amyloidové depozity, potom tento pacient pravdepodobne trpí Alzheimerovou chorobou. Táto metóda sa môže tiež použiť u asymptomatických pacientov. Prítomnosť abnormálnych depozitov amyloidu naznačuje náchylnosť na budúce symptomatické ochorenie. Metódy sú tiež užitočné na sledovanie progresie choroby a/alebo odozvy na liečbu u pacientov, ktorým bola v minulosti diagnostikovaná Alzheimerova choroba.

Metódy sú založené na podaní činidla, ako je protilátka, ktorá sa viaže na A $\beta$ , pacientovi a potom na detekcii činidla po tom, ako sa naviaže. Výhodné protilátky sa viažu na depozity A $\beta$  u pacienta bez viazania sa na polypeptid APP úplnej dĺžky. Protilátky viažuce sa na epitop A $\beta$  v rámci aminokyselín 1-10 sú zvlášť výhodné. V niektorých metódach sa protilátka viaže na epitop v rámci aminokyselín A $\beta$  7-10. Takéto protilátky sa obvykle viažu bez vyvolania podstatnej clearingovej odozvy. V iných metódach sa protilátka viaže na epitop v rámci aminokyselín A $\beta$  1-7. Takéto protilátky sa obvykle viažu a vyvolávajú

clearingovú odozvu k A $\beta$ . Clearingovej odozve sa však možno vyhnúť použitím fragmentov protilátky, ktoré nemajú konštantnú oblasť úplnej dĺžky, ako sú Fabs. V niektorých metódach môže rovnaká protilátka slúžiť ako liečebné aj diagnostické činidlo. Protilátky viažuce sa vo všeobecnosti na epitopy C-konca k A $\beta$  zvyšku 10 nedávajú taký silný signál ako protilátky viažuce sa k epitopom v rámci zvyškov 1-10, pravdepodobne preto, že C-koncové epitopy v amyloidových depozitoch sú neprístupné. Takéto protilátky sú preto menej výhodné.

Diagnostické činidlá sa môžu podať intravenóznou injekciou do tela pacienta alebo priamo do mozgu intrakraniálnou injekciou alebo vyvrtaním diery v lebke. Dávkovanie činidla by malo byť v rovnakých rozmedziach ako pre liečebné metódy. Činidlo je obvykle označené, aj keď v niektorých metódach primárne činidlo s afinitou na A $\beta$  je neznačkované a používa sa sekundárne značkovacie činidlo, ktoré sa viaže na primárne činidlo. Výber značky závisí od prostriedkov na detekciu. Napríklad fluorescenčná značka je vhodná na optickú detekciu. Použitie paramagnetických značiek je vhodné na tomografickú detekciu bez chirurgickej intervencie. Rádioaktívne značky sa môžu tiež detegovať pomocou PET alebo SPECT.

Diagnostika sa vykoná porovnaním počtu, veľkosti a/alebo intenzity označovaných miest s zodpovedajúcimi hodnotami základnej línie. Hodnoty základnej línie môžu reprezentovať priemerné hladiny v populácii jednotlivcov netrpiacich chorobou. Hodnoty základnej línie môžu tiež reprezentovať hodnota stanovené u pacienta v minulosti. Napríklad hodnota základnej línie sa môžu určiť u pacienta pred začatím liečby a hodnoty namerané po nej sa môžu porovnať s hodnotami základnej línie. Pokles v hodnotách voči základnej línii signalizuje kladnú odozvu na liečbu.

Tento vynález sa úplnejšie opíše v nasledujúcich neobmedzujúcich príkladoch.

#### Príklady uskutočnení vynálezu

Príklad 1: Terapeutická účinnosť anti-A $\beta$  protilátok: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12 a pAb A $\beta$ 1-42

V tomto príklade sa testuje kapacita rozličných monoklonálnych a polyklonálnych protilátok na A $\beta$  z hľadiska potlačenia akumulácie A $\beta$  v mozgu heterozygótnych transgenických myší.

#### A. Projekt štúdie

Šesťdesiat samčích a samičích PDAPP heterozygótnych transgenických myší vo veku 8,5 až 10,5 mesiacov sa získalo z Charles River Laboratory. Myši sa rozdelili do šiestich skupín na liečbu s rozličnými protilátkami proti A $\beta$ . Pokiaľ to bolo možné, myši sa rozdelili do skupín rovnomerne s ohľadom na pohlavie, vek, pôvod a zdroj zvierat. Tabuľka 2 znázorňuje plán experimentu.

Tabuľka 2: Plán experimentu

| Liečebná skupina | N <sup>a</sup> | Liečebná protilátka  | Špecifická protilátka | Izotyp protilátky |
|------------------|----------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1                | 9              | žiadna (samotný PBS) | NA <sup>b</sup>       | NA                |
| 2                | 10             | Polyklonálna         | A $\beta$ 1-42        | zmiešaná          |
| 3                | 0              | mAb <sup>d</sup> 2H3 | A $\beta$ 1-12        | IgG1              |
| 4                | 8              | mAb 10D5             | A $\beta$ 3-7         | IgG1              |
| 5                | 6              | mAb 266              | A $\beta$ 13-28       | IgG1              |
| 6                | 8              | mAb 21F12            | A $\beta$ 33-42       | IgG2a             |

a. Počet myší v skupine na konci experimentu. Všetky skupiny začínali s 10 zvieratami v skupine.

b. NA: neaplikovateľné.

c. myšia polyklonálna: anti-agregovaná A $\beta$ 42.

d. mAb: monoklonálna protilátka

Ako je vidieť z tabuľky 2, protilátky zahŕňali štyri myšie A $\beta$ -špecifické monoklonálne protilátky, 2H3 (smerovaná na A $\beta$  1-12), 10D5 (smerovaná na

A $\beta$  zvyšky 3-7), 266 (smerovaná na A $\beta$  zvyšky 13-28 a viaže sa na rozpustný, ale nie na agregovaný AN1792), 21F12 (smerovaná na A $\beta$  zvyšky 33-42). Piata skupina sa liečila frakciou A $\beta$ -špecifickej polyklonálnej protilátky (vypestovanej imunizáciou s agregovaným AN1792). Negatívna kontrolná skupina dostávala samotné riedidlo, PBS, bez protilátky.

### B. Sledovanie priebehu liečby

Monoklonálne protilátky sa vstrekovali v dávke asi 10 mg/kg (za predpokladu, že myši vážili 50 g). Titre protilátky sa sledovali počas 28 týždňov liečby. Injekcie sa podávali intraperitoneálne v priemere každých sedem dní, aby sa udržiavali titre anti-A $\beta$  nad 1000. Hoci pre mAb 266 sa namerali nižšie titre, pretože sa neviazal dobre na agregovaný AN1792 použitý v skúške ako záchytný antigén, rovnaký program dávkovania sa zachoval aj pre túto skupinu. Liečba v skupine, ktorá dostávala monoklonálnu protilátku 2H3, sa prerušila po prvých troch týždňoch, pretože protilátka vymizla v *in vivo* podmienkach príliš rýchlo.

Na stanovenie titra protilátky sa podskupine troch náhodne vybratých myší z každej skupiny odobrala krv bezprostredne pred každým intraperitoneálnou injekciou, celkove 30-krát. Titre protilátky sa merali ako A $\beta$ 1-42 viažuca protilátka pomocou sendvičovej ELISA s plastovými viacjamkovými miskami pokrytými A $\beta$ 1-42, ako sa podrobne opisuje v časti Všeobecné materiály a metódy. Priemerné titre pre každý odber sú uvedené v tabuľke 3 pre polyklonálnu protilátku a monoklonály 10D5 a 21F12.

Tabuľka 3:

| týždne<br>21F12 | 21F12 | týždne<br>10D5 | 10D5  | týždne poly | poly |
|-----------------|-------|----------------|-------|-------------|------|
| 0,15            | 500   | 0,15           | 3000  | 0,15        | 1600 |
| 0,5             | 800   | 0,5            | 14000 | 0,5         | 4000 |
| 1               | 2500  | 1              | 5000  | 1           | 4500 |
| 1,5             | 1800  | 1,1            | 5000  | 1,5         | 3000 |

|     |      |     |      |     |      |
|-----|------|-----|------|-----|------|
| 2   | 1400 | 1,2 | 1300 | 2   | 1300 |
| 3   | 6000 | 2   | 3000 | 3   | 1600 |
| 3,5 | 550  | 3   | 4000 | 3,5 | 650  |
| 4   | 1600 | 3,5 | 500  | 4   | 1300 |
| 5   | 925  | 4   | 2400 | 5   | 450  |
| 6   | 3300 | 5   | 925  | 6   | 2100 |
| 7   | 4000 | 6   | 1700 | 7   | 1300 |
| 8   | 1400 | 7   | 1600 | 8   | 2300 |
| 9   | 1900 | 8   | 4000 | 9   | 700  |
| 10  | 1700 | 9   | 1800 | 10  | 600  |
| 11  | 1600 | 10  | 1800 | 11  | 600  |
| 12  | 1000 | 11  | 2300 | 12  | 1000 |
| 13  | 1500 | 12  | 2100 | 13  | 900  |
| 14  | 1300 | 13  | 2800 | 14  | 1900 |
| 15  | 1000 | 14  | 1900 | 15  | 1200 |
| 16  | 1700 | 15  | 2700 | 16  | 700  |
| 17  | 1700 | 16  | 1300 | 17  | 2100 |
| 18  | 5000 | 17  | 2200 | 18  | 1800 |
| 19  | 900  | 18  | 2200 | 19  | 1800 |
| 20  | 300  | 19  | 2500 | 20  | 1200 |
| 22  | 1750 | 20  | 980  | 22  | 1000 |
| 23  | 1600 | 22  | 2000 | 23  | 1200 |
| 24  | 1000 | 23  | 1000 | 24  | 675  |
| 25  | 1100 | 24  | 850  | 25  | 850  |
| 26  | 2250 | 25  | 600  | 26  | 1600 |
| 27  | 1400 | 26  | 1100 | 27  | 1900 |
| 28  |      | 27  | 1450 | 28  |      |
|     |      | 28  |      |     |      |

Priemerné titre boli okolo 1000 počas tohto obdobia pre prípravok polyklonálnej protilátky a boli mierne vyššie ako táto hodnota pre zvieratá liečené 10D5 a 21F12.

Liečenie prebiehalo počas šesťmesačného obdobia celkove 196 dní. Zvieratá sa utratili týždeň po poslednej dávke.



### C. Hladiny A $\beta$ a APP v mozgu:

Po šiestich mesiacoch liečby s rozličnými prípravkami anti-A $\beta$  protlátok sa mozgy zo zvierat vyňali a perfundovali v soľnom roztoku. Jedna hemisféra sa pripravila pre imunohistochemickú analýzu a druhá sa použila na kvantifikáciu hladín A $\beta$  a APP. Na meranie koncentrácií rozličných foriem beta-amyloidového peptidu a amyloidového prekursorového proteínu (APP) sa hemisféra rozobrala a pripravili sa homogenáty hipokampálnej, kortikálnej a cerebelárnej oblasti v 5M guanidíne. Tieto sa sériovo zriedili a hladiny amyloidového peptidu alebo APP sa kvantifikovali porovnaním série zriedení štandardov A $\beta$  peptidu alebo APP so známymi koncentraciami vo formáte ELISA.

Hladiny celkového A $\beta$  a A $\beta$ 1-42 merané metódou ELISA v homogenátoch kortexu a hipokampu a hodnoty celkového A $\beta$  v cerebelle sú uvedené v tabuľkách 4, 5, resp. 6. Medián koncentrácie celkového A $\beta$  pre kontrolnú skupinu, ktorej sa podával PBS, bol 3,6-krát vyšší v hipokampe než v kortexe (medián 63,389 ng/g hipokampálneho tkaniva v porovnaní s 17,818 ng/g pre kortex). Medián hladiny v cerebelle kontrolnej skupiny (30,6 ng/g tkaniva) bol viac než 2000-krát nižší než v hipokampe. Tieto hladiny sú podobné tým, ktoré sa publikovali v minulosti pre heterozygótne PDAPP transgenické myši v tomto veku (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie).

Pre kortex mala jedna liečebná skupina medián hladiny A $\beta$  meranej ako A $\beta$ 1-42 významne sa líšiaci od mediánu kontrolnej skupiny ( $p < 0,05$ ), v ktorej zvieratá dostávali polyklonálnu anti-A $\beta$  protilátku, ako je uvedené v tabuľke 4. Medián hladiny A $\beta$ 1-42 bol nižší o 65 % v porovnaní s kontrolou pre túto liečenú skupinu. Medián hladín A $\beta$ 1-42 bol tiež významne znížený o 55 % v porovnaní s kontrolou v jednej ďalšej liečebnej skupine, v ktorej zvieratá dostávali mAb 10D5 ( $p = 0,0433$ ).

Tabuľka 4

| Kortex                 |                |                               |                           |            |                  |              |            |                           |                  |                  |
|------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|------------|------------------|--------------|------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Liečebná skupina       | N <sup>a</sup> | Mediány                       |                           |            |                  |              |            | Priemery                  |                  |                  |
|                        |                | Celkový Aβ                    |                           |            | Aβ42             |              |            | Celkový Aβ                |                  | Aβ42             |
|                        |                | hodnota <sup>b</sup><br>ELISA | hodnota <sup>c</sup><br>P | Zmena<br>% | Hodnota<br>ELISA | Hodnota<br>P | Zmena<br>% | Hodnota<br>ELISA          | Hodnota<br>ELISA | Hodnota<br>ELISA |
| PBS                    | 9              | 17818                         | NA <sup>d</sup>           | NA         | 13802            | NA           | NA         | 16150+/-7456 <sup>e</sup> | 12621+/-5738     |                  |
| Polyklonálna anti-Aβ42 | 10             | 6160                          | 0,0055                    | -65        | 4892             | 0,0071       | -65        | 5912+/-4492               | 4454+/-3347      |                  |
| mAb 10D5               | 8              | 7915                          | 0,1019                    | -56        | 6214             | 0,0433       | -55        | 9695+/-6929               | 6943+/-3351      |                  |
| mAb 266                | 6              | 9144                          | 0,1255                    | -49        | 8481             | 0,1255       | -39        | 9204+/-9293               | 7489+/-6921      |                  |
| mAb 21F12              | 8              | 15158                         | 0,2898                    | -15        | 13578            | 0,7003       | -2         | 12481+/-7082              | 11005+/-6324     |                  |

Poznámky:

a. Počet zvierat v skupine na konci experimentu

b. ng/g tkaniva

c. Mann-Whitneyova analýza

d. NA: neaplikovateľné

e. Smerodajná odchýlka

V hipokampe nebol medián percentuálnej redukcie celkového A $\beta$  súvisiacej s liečbou polyklonálnou anti-A $\beta$  protilátkou (50 %,  $p = 0,0055$ ) väčší ako medián pozorovaný v kortexe (65 %) (tabuľka 5). Absolútna veľkosť redukcie však bola skoro 3-krát väčšia v hipokampe než v kortexe, čisté zníženie 31,683 ng/g tkaniva v hipokampe oproti 11,658 ng/g tkaniva v kortexe. Keď sa meralo ako hladina viac amyloidogénnej formy A $\beta$ , A $\beta$ 1-42, namiesto celkového A $\beta$ , dosiahnuté zníženie s polyklonálnou protilátkou bolo významné ( $p = 0,0025$ ). Hladiny mediánov v skupinách liečených mAbs 10D5 a 266 sa znížili o 33 %, resp. 21 %.

Tabuľka 5

| Hipokampus                |                |                               |                           |            |                  |              |                            |                  |                  |                  |
|---------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|------------|------------------|--------------|----------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                           | N <sup>a</sup> | Mediány                       |                           |            |                  |              | Priemery                   |                  |                  |                  |
|                           |                | Celkový Aβ                    |                           |            | Aβ42             |              | Celkový Aβ                 |                  | Aβ42             |                  |
|                           |                | hodnota <sup>b</sup><br>ELISA | hodnota <sup>c</sup><br>P | Zmena<br>% | Hodnota<br>ELISA | Hodnota<br>P | Hodnota<br>ELISA           | Hodnota<br>ELISA | Hodnota<br>ELISA | Hodnota<br>ELISA |
| PBS                       | 9              | 63389                         | NA <sup>d</sup>           | NA         | 54429            | NA           | 58351+/-13308 <sup>e</sup> | 52801+/-14701    |                  |                  |
| Polyklonálna<br>anti-Aβ42 | 10             | 31706                         | 0,0055                    | -50        | 27127            | 0,0025       | 30058+/-22454              | 24853+/-18262    |                  |                  |
| mAb 10D5                  | 8              | 46779                         | 0,0675                    | -26        | 36290            | 0,0543       | 44581+/-18632              | 36465+/-17146    |                  |                  |
| mAb 266                   | 6              | 48689                         | 0,0990                    | -23        | 43034            | 0,0990       | 36419+/-27304              | 32919+/-25372    |                  |                  |
| mAb 21F12                 | 8              | 51563                         | 0,7728                    | -19        | 47961            | 0,8099       | 57327+/-28927              | 50305+/-23927    |                  |                  |

a. Počet zvierat v skupine na konci experimentu

b. ng/g tkaniva

c. Mann-Whitneyova analýza

d. NA: neaplikovateľné

e. Smerodajná odchýlka

Celkový A $\beta$  sa tiež meral v cerebelle (tabuľka 6). Tie skupiny, ktorým sa podávali polyklonálne protilátky anti-A $\beta$  a 266, ukázali významné zníženia hladín celkového A $\beta$  (43 %, resp. 46 %,  $p = 0,0033$ , resp.  $p = 0,0184$ ) a skupina liečená 10D5 mala temer významné zníženie (29 %,  $p = 0,0675$ ).

Tabuľka 6

| CEREBELLUM                     |                |                               |                           |         |                                |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|---------|--------------------------------|
| Liečebná skupina               | N <sup>a</sup> | Mediány                       |                           |         | Priemery                       |
|                                |                | Celkový A $\beta$             |                           |         | Celkový A $\beta$              |
|                                |                | Hodnota <sup>b</sup><br>ELISA | Hodnota <sup>c</sup><br>P | Zmena % | Hodnota<br>ELISA               |
| PBS                            | 9              | 30,64                         | NA <sup>d</sup>           | NA      | 40,00 $\pm$ 31,89 <sup>e</sup> |
| Polyklonálna anti-A $\beta$ 42 | 10             | 17,61                         | 0,0033                    | -43     | 18,15 $\pm$ 4,36               |
| mAb 10D5                       | 8              | 21,68                         | 0,0675                    | -29     | 27,29 $\pm$ 19,43              |
| mAb 266                        | 6              | 16,59                         | 0,0184                    | -46     | 19,59 $\pm$ 6,59               |
| mAb 21F12                      | 8              | 29,80                         | >0,9999                   | -3      | 32,88 $\pm$ 9,90               |

a. Počet zvierat v skupine na konci experimentu

b. ng/g tkaniva

c. Mann-Whitneyova analýza

d. NA: neaplikovateľné

e. Smerodajná odchýlka

Koncentrácia APP sa tiež stanovila metódou ELISA v kortexe a v cerebelle z myší, ktorým bola podávaná protilátka, a z kontrolných myší, ktorým bol podávaný PBS. Použili sa dve rozdielne APP skúšky. Prvá, označená ako APP- $\alpha$ /FL spoznáva APP-alfa ( $\alpha$ , vylučovaná forma APP, ktorá bola rozštiepená v sekvencii A $\beta$ ) aj formy APP s úplnou dĺžkou (FL), kým druhá spoznáva len APP- $\alpha$ . Na rozdiel od redukcie A $\beta$  spojennej s liečbou v jednej časti liečebných skupín boli hladiny APP fakticky nezmenené u všetkých liečených zvierat v porovnaní s kontrolnými zvieratami. Tieto výsledky naznačujú, že imunizácie s A $\beta$  protilátkami redukujú A $\beta$  bez redukovania APP.

Stručne povedané, hladiny A $\beta$  sa významne znížili v kortexe, hipokampe a v cerebelle u zvierat liečených polyklonálnou protilátkou vypestovanou proti AN1792. Významné liečebné účinky prejavili v menšej miere monoklonálne protilátky k amino-koncovej oblasti A $\beta$ <sub>1-42</sub>, najmä k aminokyselinám 1-16 a 13-28.

#### D. Histochemické analýzy:

Morfológia A $\beta$ -imunoreaktívnych plakov v podskupine mozgov z myší v liečebných skupinách PBS, polyklonálnej A $\beta$ <sub>42</sub>, 21F12, 266 a 10D5 sa kvalitatívne porovnala s morfológiou z predošlých štúdií, v ktorých sa použili štandardné imunizačné postupy s A $\beta$ <sub>42</sub>.

Najväčšia zmena vo veľkosti aj vo vzhľade amyloidových plakov sa vyskytla u zvierat imunizovaných polyklonálnou A $\beta$ <sub>42</sub> protilátkou. Redukcia uloženého amyloidu, rozrušená morfológia plakov a A $\beta$  imunoreaktivita spojená s bunkami značne pripomínali účinky vyvolané štandardným imunizačným postupom. Tieto pozorovania podporujú výsledky ELISA, v ktorých sa dosiahlo významné zníženie celkového A $\beta$  aj A $\beta$ <sub>42</sub> podávaním polyklonálnej A $\beta$ <sub>42</sub> protilátky.

Pri podobnom kvalitatívnom vyhodnotení sa zistilo, že amyloidové plaky v skupine 10D5 sa tiež zredukovali v počte a vzhľade, s určitými známkami A $\beta$  imunoreaktivity spojenej s bunkami. V porovnaní s kontrolnými zvieratami polyklonálna Ig frakcia proti A $\beta$  a jedna z monoklonálnych protilátok (10D5) znížili množstvo plakov o 93 %, resp. 81 % ( $p < 0,005$ ). Zistilo sa, že 21F12 má pomerne slabý účinok na množstvo plakov. Mikrografie mozgu po liečbe pAbA $\beta$ <sub>1-42</sub> ukázali difúzne depozity a neprítomnosť mnohých z väčších kompaktných plakov v liečebnej skupine pAbA $\beta$ <sub>1-42</sub> v porovnaní kontrolnými zvieratami.

### E. Lymfoproliferatívne odozvy

A $\beta$ -závislá lymfoproliferácia sa merala pomocou buniek sleziny odobra- tých osem dní po poslednej infúzii protilátky. Čerstvo odobraté bunky,  $10^5$  na jamku, sa kultivovali 5 dní v prítomnosti A $\beta$ 1-40 s koncentráciou 5  $\mu$ M na sti- muláciu. Ako pozitívna kontrola sa ďalšie bunky kultivovali s mitogénom T buniek, PHA, a ako negatívna kontrola sa bunky kultivovali bez prídavku pep- tidu.

Splenocyty zo starých PDAPP myší pasívne imunizované rozličnými anti- A $\beta$  protilátkami sa stimulovali *in vitro* AN1792 a merala sa proliferatívna a cytokínna odozva. Účelom týchto skúšok bolo stanoviť, či pasívna imunizácia uľahčuje prezentáciu antigénu, a tak inicializuje odozvy T buniek špecifické na AN1792. Žiadna proliferatívna alebo cytokínna odozva špecifická na AN1792 sa nepozorovala u myší pasívne imunizovaných anti-A $\beta$  protilátkami.

Príklad 2: Terapeutická účinnosť anti-A $\beta$  protilátok: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12, mAb 3D6, mAb 16C11 a pAb A $\beta$ 1-42

V druhej štúdii sa zopakovala liečba s 10D5 a skúšali sa dve ďalšie anti- A $\beta$  protilátky, monoklonály 3D6 (A $\beta$ 1-5) a 16C11 (A $\beta$ 33-42). Kontrolné skupi- ny dostali buď PBS alebo protilátku zodpovedajúcu irelevantnému izotypu (TM2a). Myši boli staršie (11,5 - 12 mesiacov staré heterozygóty) ako v pred- šlej štúdii, inak bol plán experimentu rovnaký. Opäť po šiestich mesiacoch liečby 10D5 znížil množstvo plakov o viac než 80 % v porovnaní buď s PBS a- lebo s kontrolami protilátok zodpovedajúcimi izotypu ( $p = 0,003$ ). Jedna z ďal- ších protilátok proti A $\beta$ , 3D6, bola rovnako účinná a vyvolala 86 % redukciu ( $p = 0,003$ ). Naopak tretia protilátka proti peptidu, 16C11, nemala žiadny úči- nok na množstvo plakov. Podobné výsledky sa získali pri meraniach ELISA s A $\beta$ 42.

Tieto výsledky názorne ukazujú, že protilátková odozva proti A $\beta$  peptidu v neprítomnosti T bunkovej imunity je dostatočná na zníženie amyloidových depozitov v PDAPP myšiach, ale aj to, že nie všetky anti-A $\beta$  protilátky sú rov-

nako účinné. Protilátky smerované na epitopy obsahujúce aminokyseliny A $\beta$  1-5 alebo 3-7 sú zvlášť účinné. Stručne povedané, môže sa ukázať, že pasívne podávané protilátky proti A $\beta$  (t.j. pasívna imunizácia) znižujú rozsah plakových depositov v myšom modeli Alzheimerovej choroby.

### Príklad 3: Sledovanie väzby protilátky v CNS

Tento príklad ukazuje, že ak sa udržuujú mierne koncentrácie protilátok v sére (25-70  $\mu\text{g/ml}$ ), získajú tieto protilátky prístup do CNS v hladinách dostatočných na zasiahnutie na  $\beta$ -amyloidové plaky.

Aby sa stanovilo, či protilátky proti A $\beta$  môžu pôsobiť priamo v CNS, mozgy vybraté zo soľného roztoku z príkladu II sa vyšetrili na prítomnosť periférne podaných protilátok. Na nefixované kryostatické rezy mozgu sa pôsobilo fluorescenčným činidlom proti myšiemu imunoglobulínu (kozí anti-myš  $\text{IgG-Cy3}$ ). Plaky v mozgoch 10D5 a 3D6 liečebných skupín boli silne dekorované protilátkou, kým v skupine 16C11 nebolo žiadne zafarbenie. Aby sa zistil úplný rozsah plakových usadenín, séria rezov z každého mozgu sa najprv imunoreagovala s anti-A $\beta$  protilátkou a potom so sekundárnym činidlom. V porovnaní s 16C11 skupinou sa množstvo plakov značne znížilo v týchto liečebných skupinách. Vniknutie protilátky do CNS nebol spôsobený abnormálnym prenikaním cez hematoencefalitickú bariéru, pretože vaskulárna priepustnosť sa nezvýšila, ako sa nameralo pomocou Evans Blue v PDAPP myšiach. Okrem toho koncentrácia protilátky v mozgovom parenchýme starých PDAPP myší bola rovnaká ako v netransgenických myšiach a predstavuje 0,1 % koncentrácie protilátky v sére (bez ohľadu na izotyp).

Tieto údaje naznačujú, že periférne podávané protilátky môžu prenikať do CNS, kde môžu priamo vyvolať odstraňovanie amyloidu. Je pravdepodobné, že 16C11 mal tiež prístup k plakom, ale nebol schopný naviazať sa.



Príklad 4: *Ex vivo* skriningová skúška na aktivitu protilátky proti amyloidovým depozitom

Na vyšetrenie účinku protilátok na odstraňovanie plakov sme pripravili *ex vivo* skúšku, v ktorej sa primárne mikrogliálne bunky kultivovali s nefixovanými kryostatickými rezmi buď PDAPP myši alebo ľudských AD mozgov. Mikrogliálne bunky sa získali z cerebrálnych kortexov novonarodených DBA/2N myší (1 - 3 dni). Kortexy sa mechanicky disociovali v HBSS<sup>-</sup> (Hanksov vyvážený soľný roztok, Sigma) s 50 µg/ml DNázy I (Sigma). Disociované bunky sa prefiltrovali 100 µm sitom (Falcon) a odstredovali sa 5 minút pri 1000 ot/min. Peleta sa resuspendovala v rastovom médiu (vysoko glukózový DMEM, 10 % FBS, 25 ng/ml rmGM-CSF) a bunky sa naniesli s hustotou 2 mozgov na T-75 plastovú kultivačnú nádobu. Po 7 - 9 dňoch sa nádobky nechali rotovať na orbitálnej trepačke 2 hodiny pri 37 °C a pri 200 ot/min. Bunková suspenzia sa odstredila pri 1 000 ot/min a resuspendovala v skúšobnom médiu.

10 µm kryostatické rezy PDAPP myších mozgov alebo ľudských AD mozgov (post mortem čas < 3 hodiny) sa nechali rozpustiť na polylyzínom pokrytých okrúhlych sklíčkach a umiestnili sa do jamiek 24-jamkových tkanivových kultivačných misiek. Sklíčka sa opláchli dvakrát skúšobným médiom obsahujúcim H-SFM (voľné médium hybridóm-sérum, Gibco BRL) s 1 % FBS, glutamínom, penicilínom/streptomycínom a 5 ng/ml rmGM-CSF (R&D). Kontrolné alebo anti-Aβ protilátky sa pridávali 1 hodinu v 2x koncentrácii (konečná 5 µg/ml). Potom sa naočkovali mikrogliálne bunky s hustotou 0,8x10<sup>6</sup> buniek/ml skúšobného média. Kultúry sa udržiavali vo zvlhčujúcom inkubátore (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 24 hodín alebo viac. Na konci inkubácie sa kultúry fixovali 4 % paraformaldehydom a permeabilizovali sa 0,1 % Tritonom-X100. Rezy sa zafarbili biotinylovaným 3D6 a potom konjugátom streptavidín / Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Exogénne mikrogliálne bunky sa vizualizovali jadrovým farbením (DAPI). Kultúry sa pozorovali v invertnom fluorescenčnom mikroskope (Nikon, TE300) a nasníмали sa mikrofotografie digitálnou kamerou SPOT pomocou SPOT softvéru (Diagnostic Instruments). Na Western blot analýzu sa kultúry extrahovali v 8M močovine zriedenej 1:1 v redukujúcom tricínovom vzorkovom tlmivom roztoku a naniesli sa na 16 % tricínový gél (Novex). Po

prenose na immobilon sa škvrny exponovali 5 µg/ml pabAβ42 a potom HRP-konjugovanou anti-myšou protilátkou a vyvolali sa s ECDL (Amersham).

Keď sa skúška vykonala s PDAPP mozgovými rezmi v prítomnosti 16C11 (jedna z protilátok proti Aβ, ktorá nebola účinná *in vivo*), β-amyloidové plaký zostali intaktné a nepozorovala sa žiadna fagocytóza. Naproti tomu, keď sa susediace rezy kultivovali v prítomnosti 10D5, amyloidové depozity väčšinou zmizli a mikrogliálne bunky prejavili početné fagocytické vezikuly obsahujúce Aβ. Identické výsledky sa získali s rezmi AD mozgov; fagocytóza AD plakov indukovaná 10D5, kým 16C11 bola neúčinná. Okrem toho skúška poskytla porovnateľné výsledky, keď sa vykonali buď s myšími alebo s ľudskými mikrogliálnymi bunkami a s myšími, králičími protilátkami alebo s protilátkami primátov proti Aβ.

Tabuľka 7 porovnáva väzbu Aβ oproti fagocytóze pre niektoré rozličné väzbové špecificity protilátok. Je vidieť, že protilátky viažuce sa na epitopy v rámci aminokyselín 1-7 viažu a odstraňujú amyloidové depozity, kým protilátky viažuce sa k epitopom v rámci aminokyselín 4-10 sa viažu bez odstraňovania amyloidových depozitov. Protilátky viažuce sa na epitopy C-konca ku zvyšku 10 sa ani neviažu a ani neodstraňujú amyloidové depozity.

Tabuľka 7: Analýza epitopovej špecificity

|                        | <u>Protilátka</u> |               |                 |                   |
|------------------------|-------------------|---------------|-----------------|-------------------|
|                        | <u>Epitop</u>     | <u>Izotyp</u> | <u>Farbenie</u> | <u>Fagocytóza</u> |
| <u>N-koniec</u>        |                   |               |                 |                   |
| mab                    |                   |               |                 |                   |
| 3D6                    | 1-5               | IgG2b         | +               | +                 |
| 10D5                   | 3-7               | IgG1          | +               | +                 |
| 22C8                   | 3-7               | IgG2a         | +               | +                 |
| 6E10                   | 5-10              | IgG1          | +               | -                 |
| 14A8                   | 4-10              | potkaní IgG1  | +               | -                 |
| <u>aminokys. 13-28</u> |                   |               |                 |                   |
| 18G11                  | 10-18             | potkaní IgG1  | -               | -                 |

|                       |         |       |   |   |
|-----------------------|---------|-------|---|---|
| 266                   | 16-24   | IgG1  | - | - |
| 22D12                 | 18-21   | IgG2b | - | - |
| <u>C-koniec</u>       |         |       |   |   |
| 2G3                   | -40     | IgG1  | - | - |
| 16C11                 | -40/-42 | IgG1  | - | - |
| 21F12                 | -42     | IgG2a | - | - |
| <u>Imunitné sérum</u> |         |       |   |   |
| kráľičie (CFA)        | 1-6     |       | + | + |
| myšie (CFA)           | 3-7     |       | + | + |
| myšie (QS-21)         | 3-7     |       | + | + |
| opičie (QS-21)        | 1-5     |       | + | + |
| myšie (MAPI1-7)       |         |       | + | + |

### Protilátka

V tabuľke 8 sú výsledky získané s niekoľkými protilátkami proti A $\beta$ , pričom sa porovnávajú ich schopnosti vyvolať fagocytózu v skúške *ex vivo* a znížiť množstvo plakov *in vivo* v štúdiách s pasívnym prenosom. Hoci 16C11 a 21F12 sa viažu na agregovaný syntetický A $\beta$  peptid s vysokou afinitou, tieto protilátky neboli schopné reagovať s  $\beta$ -amyloidovými plakmi v nefixovaných mozgových rezoch, neboli schopné aktivovať fagocytózu v skúške *ex vivo* a neboli účinné *in vivo*. 10D5, 3D6 a polyklonálna protilátka proti A $\beta$  boli aktívne vo všetkých troch meraniach. Tieto výsledky ukazujú, že účinnosť *in vivo* je spôsobená priamym odstraňovaním plakov sprostredkovaným protilátkou v CNS a že skúška *ex vivo* má prognostický význam pre účinnosť *in vivo*.

Tabuľka 8: Skúška *ex vivo* ako predpoveď účinnosti *in vivo*

| Protilátka   | Izotyp | Afinita na<br>agregovaný<br>A $\beta$ (pM) | Väzba na $\beta$ -<br>amyloidové<br>plaky | Účinnosť<br><i>ex vivo</i> | Účinnosť<br><i>in vivo</i> |
|--------------|--------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| monoklonálna |        |                                            |                                           |                            |                            |
| 3D6          | IgG2b  | 470                                        | +                                         | +                          | +                          |
| 10D5         | IgG1   | 43                                         | +                                         | +                          | +                          |
| 16C11        | IgG1   | 90                                         | -                                         | -                          | -                          |
| 21F12        | IgG2a  | 500                                        | -                                         | -                          | -                          |
| TM2a         | IgG1   | -                                          | -                                         | -                          | -                          |
| polyklonálna |        |                                            |                                           |                            |                            |
| 1-42         | mix    | 600                                        | +                                         | +                          | +                          |

Rovnaká skúška sa použila na testovanie clearingovej aktivity protilátky proti fragmentu synukleínu označovaného ako NAC. Ukázalo sa, synukleín je proteín súvisiaci s amyloidovými plakmi. Ako predtým, protilátka k NAC sa priviedla do styku so vzorkou mozgového tkaniva obsahujúceho amyloidové plaky a s mikrogliálnymi bunkami. Ako kontrola sa použilo králičie sérum. Následné pozorovanie ukázalo značné zníženie počtu a veľkosti plakov, čo poukazuje na clearingovú aktivitu protilátky.

Na potvrdenie toho, že A $\beta$  sa internalizovalo v priebehu skúšky *ex vivo*, sa použila konfokálna mikroskopia. V prítomnosti kontrolných protilátok zostali exogénne mikrogliálne bunky v konfokálnej rovine nad tkanivom, neboli tam žiadne fagocytické vezikuly obsahujúce A $\beta$  a plaky v reze ostávali nezmenené. V prítomnosti 10D5 bol temer všetok materiál plakov uzatvorený vo vezikulách v exogénnych mikrogliálnych bunkách. Na zistenie osudu internalizovaného peptidu sa kultúry liečené 10D5 extrahovali 8M močovinou v rozličných časoch a vyšetrili sa Western blot analýzou. V čase jednej hodiny, keď ešte nedochádzalo k žiadnej fagocytóze, reakcia s polyklonálnou protilátkou proti A $\beta$  ukázala silný 4 kD pás (odpovedajúci A $\beta$  peptidu). A $\beta$  imunoreaktivita sa znížila v čase 1 deň a bola neprítomná v čase 3 dni. Protilátkou sprostredkovaná fagocytóza A $\beta$  teda vedie k jej degradácii.

Na určenie toho, či fagocytóza v skúške *ex vivo* bola sprostredkovaná Fc, pripravili sa F(ab')<sub>2</sub> fragmenty anti-A $\beta$  protilátky 3D6. Hoci F(ab')<sub>2</sub> fragmenty si zachovali plnú funkčnosť na reakciu s plakmi, neboli schopné aktivovať fagocytózu mikrogliálnych buniek. Okrem toho fagocytóza s celou protilátkou mohla byť blokovaná činidlom proti myším Fc receptorom (anti-CD16/32). Tieto údaje naznačujú, že k odstraňovaniu A $\beta$  *in vivo* dochádza prostredníctvom fagocytózy sprostredkovanej Fc receptormi.

#### Príklad 5: Prenikanie protilátok cez hematoencefalitickú bariéru

V tomto príklade sa stanovuje koncentrácia protilátky dopravenej do mozgu po intravenóznejskej injekcii do periférneho tkaniva buď normálnych alebo PDAPP myší. PDAPP alebo kontrolné normálne myši sa po liečbe perfundovali 0,9 % NaCl. Oblasť mozgu (hipokampus alebo kortex) sa oddelili a rýchlo zmrazili. Mozog sa homogenizoval v 0,1 % tritone + inhibítoroch proteázy. V extraktoch sa detegoval imunoglobulín metódou ELISA. Ako zachytňné činidlo sa na RIA platňu naniesol F(ab')<sub>2</sub> kozí anti-myšiej IgG. Sérum alebo mozgové extrakty sa inkubovali 1 hodinu. Izotypy sa detegovali anti-myšiej IgG1-HRP alebo IgG2a-HRP alebo IgG2b-HRP (Caltag). V CNS boli prítomné protilátky, bez ohľadu na izotyp, v koncentrácii, ktorá je 1:1000 tej, ktorá sa našla v krvi. Keď napríklad koncentrácia IgG1 v krvi bola trikrát väčšia ako koncentrácia IgG2, bola rovnako trikrát väčšia v mozgu, pričom obidve látky boli prítomné v 0,1 % ich zodpovedajúcich hladín v krvi. Tento výsledok sa pozoroval v transgenických aj v netransgenických myšiach, čo naznačuje, že PDAPP myši nemajú špecificky priepustnú hematoencefalitickú bariéru.

#### Príklad VI: Klonovanie a sekvenovanie myšiej 3D6 variabilných oblastí

*Klonovanie a analýza sekvencie VH 3D6.* Variabilná VH oblasť ťažkého reťazca 3D6 sa klonovala RT-PCR pomocou mRNA pripravenej z hybridómových buniek dvoma nezávislými metódami. V prvej metóde sa konsenzuálne priméry použili do VH oblasti leader peptidu zahŕňajúceho translačný iniciačný

kodón ako 5'primér (DNA #3818-3829) a špecifický 3'primér g2b (DNA #3832) konštantných oblastí. Sekvencie z PCR amplifikovaného produktu, ako aj z opakovane nezávisle odvodených klonov, úplne navzájom súhlasili. Ako ďalšia kontrola sekvencie vo VH oblasti 3D6 sa výsledok potvrdil sekvenovaním VH fragmentu získaného metodológiou 5'RACE RT-PCR a 3'g2b špecifického priméru (DNA #3832). Sekvencia sa opäť odvodila z PCR produktu, ako aj z viacnásobne nezávisle izolovaných klonov. Obe sekvencie sa navzájom úplne zhodujú (s výnimkou V8I substitúcie v leader oblasti z 5'RACE produktu), čo naznačuje, že sekvencie sú odvodené z mRNA kódujúcej VH oblasť 3D6. Nukleotid (SEQ ID NO:3) a sekvencia aminokyselín (SEQ ID NO:4) VH oblasti 3D6 sú uvedené v tabuľke 9A, resp. na obrázku 2.

Tabuľka 9A: Sekvencia nukleotidov myšej VH 3D6

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCCTTGTTTTAAAGGTGTCCAGTGTGA  
 AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAAT  
 TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAACCTACTA  
 TTCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGT  
 ACCTGCAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTGTCAGATAT  
 GATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACT (SEQ ID NO:3)

\*Leader peptid je podčiarknutý.

*Klonovanie a analýza sekvencie VL 3D6.* Variabilná VL oblasť ľahkého reťazca 3D6 sa klonovala analogickým spôsobom ako VH oblasť. V prvom pokuse sa vytvorila sada konsenzuálnych primérov na amplifikáciu myších VL oblastí nasledujúcim spôsobom: pripravili sa 5' priméry (DNA #3806-3816) na hybridizáciu do VL oblasti obsahujúcej translačný iniciačný kodón a 3'primér (DNA #3817) bol špecifický pre myšiu Ck oblasť nadol od V-J spojovacej oblasti. Analýza sekvencie DNA PCR fragmentu, ako aj nezávisle odvodené klony izolované pomocou konsenzuálnej sady primérov ľahkého reťazca ukázali, že

získaná cDNA bola odvodená z nefunkčne preskupenej informácie, pretože sekvencia obsahovala rámcovo posunutú mutáciu medzi spojkou V-J oblasti.

V druhom pokuse, sa použil 5'RACE na klonovanie druhej VL kódujúcej cDNA. Analýza sekvencie DNA tohto produktu (konsenzus 11) ukázala, že kodoval funkčnú mRNA. Možno teda usúdiť, že sekvencia kóduje správnu mRNA ľahkého reťazca 3D6. Nukleotid (SEQ ID NO:1) a sekvencia aminokyselín (SEQ ID NO:2) VL oblasti 3D6 sú uvedené v tabuľke 9B, resp. na obrázku 1.

#### Tabuľka 9B: Sekvencia nukleotidov myšej VL 3D6

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGG  
TTATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTTGGACAACCAGCCT  
 CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT  
 TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACT  
 GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGA  
 AAATCAGCAGAATAGAGGCTGAGGATTTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT  
 TTCCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:1)

\*Leader peptid je podčiarknutý.

Priméry použité na klonovanie 3D6 VL cDNA sú uvedené v tabuľke 10.

Tabuľka 10.

| DNA  | Veľ-<br>kosť | Kódujú-<br>ci reť'a-<br>zec? | DNA sekvencia                                                                                                   | Komentáre                                                                                                                                                       |
|------|--------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3806 | 40           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GAA . GTT . GCC .<br>TGT . TA<br>G . GCT . GTT . GGT . GCT . G (SEQ ID<br>NO: 39)       | myší kapa variabilný<br>primér 1<br>MKV PRIMÉR 1, MRC<br>sada; % A+T = 50,00<br>[20]; % C+G = 50,00 [20]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 72,90 °C     |
| 3807 | 39           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GGA . GWC . AGA .<br>CAC . AC<br>T . CCT . GYT . ATG . GGT (SEQ ID<br>NO: 40)           | myší kapa variabilný<br>primér 2<br>MKV PRIMÉR 2, MRC<br>sada; % A+T = 46,15<br>[18%]; % C+G = 48,72<br>[19]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 72,05 °C |
| 3808 | 40           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GAG . TGT . GCT .<br>CAC . TC<br>A . GGT . CCT . GGS . GTT . G (SEQ ID<br>NO: 41)       | myší kapa variabilný<br>primér 3<br>MKV PRIMÉR 3, MRC<br>sada; % A+T = 45,00<br>[20]; % C+G = 52,50 [21]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 73,93 °C     |
| 3809 | 43           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GAG . GRC . CCC .<br>TGC . TC<br>A . GWT . TYT . TGG . MWT . CTT . G (SEQ<br>ID NO: 42) | myší kapa variabilný<br>primér 4<br>MKV PRIMÉR 4, MRC<br>sada; % A+T = 41,86<br>[18]; % C+G = 46,51 [20]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 72,34 °C     |
| 3810 | 40           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GGA . TTT . WCA .<br>GGT . GCA . GAT . TWT . CAG . CTT . C<br>(SEQ ID NO: 43)           | myší kapa variabilný<br>primér 5<br>MKV PRIMÉR 5, MRC<br>sada; % A+T = 52,50<br>[21]; % C+G = 42,50 [17]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 69,83 °C     |
| 3811 | 37           | Áno                          | ACT . AGT . CGA . CAT . GAG . GTK . CYY .<br>TGY . TS<br>A . GYT . YCT . GRG . G (SEQ ID<br>NO: 44)             | myší kapa variabilný<br>primér 6<br>MKV PRIMÉR 6, MRC<br>sada; % A+T = 37,84<br>[14]; % C+G = 40,54 [15]                                                        |



|      |    |     |                                                                                   |                                                                                                                                                                         |
|------|----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |    |     |                                                                                   | Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 68,01 °C                                                                                                                         |
| 3812 | 41 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CWT.CAA.<br>GAT.GG<br>A.GTC.ACA.KWY.YCW.GG (SEQ ID<br>NO: 45) | myší kapa variabilný<br>primér 7<br>MKV PRIMÉR 7, MRC<br>sada; % A+T = 39,02<br>[16]; % C+G = 46,34 [19]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 71,70 °C             |
| 3813 | 41 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GTG.GGG.AYC.<br>TKT.TT<br>Y.CMM.TTT.TTC.AAT.TG (SEQ ID<br>NO: 46) | myší kapa variabilný<br>primér 8<br>MKV PRIMÉR 8, MRC<br>sada; % A+T = 53,66<br>[22]; % C+G = 34,15 [14]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,70 °C             |
| 3814 | 35 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGT.RTC.CWC.<br>ASC.TC<br>A.GTT.CCT.TG (SEQ ID NO:47)             | myší kapa variabilný<br>primér 9<br>MKV PRIMÉR 9, MRC<br>sada; % A+T = 45,71<br>[16]; % C+G = 45,71 [16]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 69,36 °C             |
| 3815 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GTA.TAT.ATG.<br>TTT.GT<br>T.GTC.TAT.TTC.T (SEQ ID<br>NO: 48)      | myší kapa variabilný<br>primér 10<br>MKV PRIMÉR 10, MRC<br>sada; % A+T = 70,27<br>[26]; % C+G = 29,37 [11]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 63,58 °C           |
| 3816 | 38 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.AGC.CCC.<br>AGC.TC<br>A.GCT.TCT.CTT.CC (SEQ ID<br>NO: 49)     | myší kapa variabilný<br>primér 11<br>MKV PRIMÉR 11, MRC<br>sada; % A+T = 44,74<br>[17]; % C+G = 55,26 [21]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 74,40 °C           |
| 3817 | 27 | Nie | GGA.TCC.CGG.GTG.GAT.GGT.GGG.<br>AAG.AT<br>G (SEQ ID NO:50)                        | myší kapa reverzný pri-<br>mér ľahkého reťazca, aa<br>116-122;<br>Ck primér konštantnej<br>oblasti, MRC sada+SmaI<br>miesto;<br>% A+T = 47,06 [8]; %<br>C+G = 52,94 [9] |

|      |    |     |                                                                                 |                                                                   |
|------|----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|      |    |     |                                                                                 | Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 57,19 °C                   |
| 3818 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.ATG.CAG.<br>CTG.GG<br>T.CAT.STT.CTT.C (SEQ ID<br>NO:51)     | myši ťažký variabilný<br>primér 1<br>MHV primér 1, MRC sa-<br>da; |
| 3819 | 36 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.ATG.GAG.<br>CTR.TA<br>T.CAT.SYT.CTT (SEQ ID NO:52)          | myši ťažký variabilný<br>primér 2<br>MHV primér 2, MRC sa-<br>da; |
| 3820 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GWT.GTG.<br>GTT.AA<br>A.CTG.GGT.TTT.T (SEQ ID<br>NO:53)     | myši ťažký variabilný<br>primér 3<br>MHV primér 3, MRC sa-<br>da; |
| 3821 | 35 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GRA.CTT.TGG.<br>GYT.CA<br>G.CTT.GRT.TT (SEQ ID NO:54)           | myši ťažký variabilný<br>primér 4<br>MHV primér 4, MRC sa-<br>da; |
| 3822 | 40 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.CTC.CAG.<br>GCT.CA<br>A.TTT.AGT.TTT.CCT.T (SEQ ID<br>NO:55) | myši ťažký variabilný<br>primér 5<br>MHV primér 5, MRC sa-<br>da; |
| 3823 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGC.TGT.CYT.<br>RGS.GC<br>T.RCT.CTT.CTG.C (SEQ ID<br>NO:56)     | myši ťažký variabilný<br>primér 6<br>MHV primér 6, MRC sa-<br>da; |
| 3824 | 36 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGR.ATG.GAG.<br>CKG.GR<br>T.CTT.TMT.CTT (SEQ ID NO:57)          | myši ťažký variabilný<br>primér 7<br>MHV primér 7, MRC sa-<br>da; |
| 3825 | 33 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.AGT.GCT.<br>GAT.TC<br>T.TTT.GTG (SEQ ID NO:58)              | myši ťažký variabilný<br>primér 8<br>MHV primér 8, MRC sa-<br>da; |
| 3826 | 40 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGM.TTG.GGT.<br>GTG.GA<br>M.CTT.GCT.ATT.CCT.G (SEQ ID<br>NO:59) | myši ťažký variabilný<br>primér 9<br>MHV primér 9, MRC sa-<br>da; |
| 3827 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CAG.ACT.<br>TAC.AT<br>T.CTC.ATT.CCT.G (SEQ ID<br>NO:60)     | myši ťažký variabilný<br>primér 10<br>MHV primér 10, MRC<br>sada; |

|      |    |     |                                                                              |                                                                                    |
|------|----|-----|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 3828 | 38 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.TGG.<br>GCT.GA<br>T.TTT.TTT.TAT.TG (SEQ ID<br>NO:61) | myši ťažký variabilný<br>primér 11<br>MHV primér 11, MRC<br>sada;                  |
| 3829 | 37 | Áno | ACT.AGT.CGA.CAT.GAT.GGT.GTT.<br>AAG.TC<br>T.TCT.GTA.CCT.G (SEQ ID<br>NO:62)  | myši ťažký variabilný<br>primér 12<br>MHV primér 12, MRC<br>sada;                  |
| 3832 | 27 | Nie | GGA.TCC.CGG.GAG.TGG.ATA.GAC.<br>tGA.TG<br>G (SEQ ID NO:63)                   | myši IgG2b reverzný pri-<br>mér ťažkého reťazca<br>poloha aa 119-124, MRC<br>sada; |

Od N-konca k C-koncu ľahký aj ťažký reťazec obsahujú domény FR1, CDR1, CDR2, FR3, CDR3 a FR4. Priradenie aminokyselín v každej doméne je v súlade s číselnou konvenciou Kabata a kol., pozri vyššie.

*Expresia chimérickej 3D6 protilátky:* Variabilné oblasti ťažkého a ľahkého reťazca sa skonštruovali tak, aby kodovali spleťacie donorné sekvencie nadol od zodpovedajúcej VDJ alebo VJ spojky a naklonovali sa do cicavčieho expresného vektora pCMV-hy1 pre ťažký reťazec a pCMV-hk1 pre ľahký reťazec. Tieto vektory kódujú ľudské  $\gamma 1$  a C $\kappa$  konštantné oblasti ako exonické fragmenty nadol od vloženej kazety variabilnej oblasti. Po verifikácii sekvencie sa expresné vektory ťažkého reťazca a ľahkého reťazca kotransfektovali do COS buniek. Na potvrdenie reprodukovateľnosti výsledku sa dva rozdielne klony ťažkého reťazca (H2.2 a H3.2) nezávisle kotransfektovali s tromi rozličnými chimérickými klonmi ľahkého reťazca (L3, L4 a L10). Ako pozitívna kontrola vektorov sa urobila chimérická transfekcia 21.6 protilátky. Kondicionálne médiá sa odobrali 48 hodín po transfekcii a skúšali sa Western blot analýzou na produkciu protilátok alebo metódou ELISA na A $\beta$  väzbu.

Všetky viacnásobné transfektanty exprimovali kombinácie ťažký reťazec + ľahký reťazec, ktoré boli spoznané kozou anti-ľudskou IgG (H+L) protilátkou vo Western blot skúške.

Priama väzba 3D6 a chimérických 3D6 (PK1614) protilátok k A $\beta$  sa skúšala analýzou ELISA. Zistilo sa, že chimérický 3D6 sa viazal na A $\beta$  s vysokou afinitou, podobnou tej, akú prejavovalo 3D6 (obrázok 3A). Ďalej, kompetičná inhibičná skúška na báze ELISA ukázala, že chimérická 3D6 a myšia 3D6 protilátka rovnako konkurujú vo väzbe biotinylovanému 3D6 k A $\beta$  (obrázok 3B). Chimérická protilátka ukázala väzbové vlastnosti nerozlíšiteľné od referenčnej vzorky 3D6.

Tabuľka 11.

| Konc<br>( $\mu$ g/ml) | 3D6   | PK1614 | IgG1  |
|-----------------------|-------|--------|-------|
| 0,037                 |       | 119,3  |       |
| 0,11                  | 118,6 | 118,9  |       |
| 0,33                  | 99,7  | 71,25  |       |
| 1                     | 98,63 | 84,53  | 134,4 |

Okrem toho 3D6 aj PK1614 boli účinné pri odstraňovaní A $\beta$  plakov. Skúška *ex vivo* ukazuje, že keď sa koncentrácia protilátky zvyšuje, množstvo A $\beta$  sa znižuje rovnakým spôsobom pre myšiu aj pre chimérickú 3D6 protilátku. Možno teda usúdiť, že sekvencie kódujú funkčné ľahké, resp. ťažké reťazce 3D6.

#### Príklad 7. Humanizácia 3D6

*Modelovanie homológie/molekulárne modelovanie.* Aby sa identifikovali kľúčové štrukturálne rámcové zvyšky v myšej 3D6 protilátke, generoval sa trojrozmerný model založený na najbližších myších protilátkach pre ťažké a ľahké reťazce. Na tento účel sa vybrala protilátka označená 1CR9 ako vzor na modelovanie ľahkého reťazca 3D6 (PDB ID: 1CR9, Kanyo a kol., pozri vyššie) a protilátka označená 1OPG sa vybrala ako vzor na modelovanie ťažkého reťazca (PDB ID: 1OPG Kodandapani a kol., pozri vyššie) (pozri tiež tabuľku 1). Porovnanie sekvencie aminokyselín 3D6 s ľahkým a ťažkým reťazcom týchto protilátok ukázal, že s výnimkou CDR3 ťažkého reťazca majú protilátky 1CR9

a 1OPG významnú sekvenčnú homológiu s 3D6. Okrem toho CDR slučky vybratých protilátok patria do rovnakých kánonických Chothiových štruktúrnych tried ako CDR slučky 3D6, opäť s výnimkou CDR3 ťažkého reťazca. Preto sa na začiatku zvolili 1CR9 a 1OPG ako protilátky s vyriešenou štruktúrou na modelovanie homológie 3D6.

Prvý návrh modelu homológie 3D6 variabilnej oblasti založeného na protilátkach uvedených vyššie sa vytvoril pomocou softvérového balíka Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5). Tento softvér sa zakúpil s trvalou licenciou od Molecular Application Group (Palo Alto, CA). Tento softvérový balík, ktorého autormi sú Dr. Michael Levitt a Chris Lee, uľahčuje proces molekulového modelovania automatizáciou krokov zahrnutých v štruktúrnom modelovaní primárnej sekvencie na vzore známej štruktúry založenej na sekvenčnej homológii. Pri práci na pracovnej stanici Silicon Graphics IRIS v prostredí UNIX sa modelovaná štruktúra automaticky vylepšuje sériou krokov minimalizujúcim energiu, aby sa odstránili nevýhodné kontakty atómov a minimalizovali elektrostatické a Van der Waalsove interakcie.

Ešte viac vylepšený model sa vytvoril pomocou modelovacích možností Quanta®. Dopyt v PDB databáze na CDR3 ťažkého reťazca 3D6 identifikoval 1qkz ako najviac homológny a majúci rovnaký počet zvyškov ako 3D6. CDR3 ťažkého reťazca 3D6 sa preto modeloval pomocou kryštalickej štruktúry 1qkz ako vzoru.  $\alpha$ -uhlíková kostra modelu 3D6 je znázornená na obrázku 4. VH doména je znázornená ako bodkovaná čiara, VL doména ako plná čiara a CDR slučky sú vyznačené formou pásy.

*Výber ľudských akceptorných protilátkových sekvencií.* Počítačovým porovnaním sekvencií aminokyselín myších variabilných oblastí so sekvenciami známych ľudských protilátok sa identifikovali vhodné ľudské akceptorné protilátkové sekvencie. Porovnanie sa vykonalo oddelene pre ťažké a ľahké reťazce 3D6. Konkrétne, variabilné domény z ľudských protilátok, ktorých sekvencie rámcových oblastí prejavovali vysoký stupeň identity sekvencií s myšími VL a VH rámcovými oblasťami, sa identifikovali dopytom v Kabatovej databá-

ze pomocou NCBI BLAST (verejne dostupné cez internetový server NCBI Národných inštitútov zdravia) na zodpovedajúce sekvencie myších rámcových oblastí.

Dve kandidátske sekvencie sa vybrali ako akceptorné sekvencie podľa uvedených kritérií: (1) homológia s predmetnou sekvenciou; (2) rovnaké kánonické CDR štruktúry s donornou sekvenciou; a (3) neprítomnosť zriedkavého aminokyselinového zvyšku v rámcových oblastiach. Zvolená akceptorná sekvencia pre VL je Kabatovo ID číslo (KABID) 019230 (Genbank prístupové č. S40342) a pre VH je KABID 045919 (Genbank prístupové č. AF115110). Prvé verzie humanizovanej 3D6 protilátky využívajú tieto akceptorné protilátkové sekvencie.

*Substitúcia aminokyselinových zvyškov.* Ako sa spomenulo vyššie, humanizované protilátky tohto vynálezu obsahujú variabilné rámcové oblasti v zásade z ľudského imunoglobulínu (akceptorného imunoglobulínu) a komplementaritu určujúce oblasti v zásade z myšieho imunoglobulínu (donorný imunoglobulín) označeného ako 3D6. Po identifikácii komplementaritu určujúcich oblastí 3D6 a vhodných ľudských akceptorných imunoglobulínov bolo treba v ďalšom kroku určiť, či, ak vôbec, substituovať zvyšky z týchto komponentov, aby sa optimalizovali vlastnosti výslednej humanizovanej protilátky. Na výber zvyškov na substitúciu sa použili kritériá opísané vyššie.

Obrázky 1 a 2 znázorňujú usporiadania pôvodných myších 3D6 VL, resp. VH s prípadnou verziou 1 humanizovanej sekvencie, zodpovedajúcu ľudskú rámcovú akceptornú sekvenciu a napokon ľudskú zárodočnú sekvenciu V oblasti prejavujúcu najvyššiu homológiu s ľudskou rámcovou akceptornou sekvenciou. Tieňované zvyšky znamenajú kánonické (súvislá výplň), vernierove (bodkovaný obrys), pakovacie (polotučné) a zriedkavé aminokyseliny (polotučná kurzíva) a sú na obrázku vyznačené. Hviezdičky označujú zvyšky spätne zmutované na myšie zvyšky v ľudskej akceptornej rámcovej sekvencii a CDR oblasti sú označené čiarou nad nimi. Súhrn zmien zavedených do verzie 1 humanizovaných 3D6 VH a VL sú uvedené v tabuľke 12.

Tabuľka 12. Súhrn zmien v humanizovanom 3D6.v1

| Zmeny                       | VL (112 zvyškov)                                                                                                                                                                                          | VH (119 zvyškov)                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hu->Mu: Rámec               | 4/112                                                                                                                                                                                                     | 3/119 (1 kánon., 1 obal)                                                                                                                                                                                                         |
| CDR 1                       | 6/16                                                                                                                                                                                                      | 3/5                                                                                                                                                                                                                              |
| CDR 2                       | 4/7                                                                                                                                                                                                       | 7/14                                                                                                                                                                                                                             |
| CDR 3                       | 5/8                                                                                                                                                                                                       | 4/10                                                                                                                                                                                                                             |
| Hu-> Mu                     | 19/112 (17%)                                                                                                                                                                                              | 17/119 (14%)                                                                                                                                                                                                                     |
| Mu->Hu: Rámec               | 13/112                                                                                                                                                                                                    | 14/119                                                                                                                                                                                                                           |
| Poznámky k spätným mutáciám | 1. I2V, ktorý je v kánonickej polohe<br>2. Y36L, ktorý je obalový zvyšok a tiež leží pod CDR<br>3. L46R, ktorý je obalový zvyšok a leží pod CDR                                                           | 4. S49A Vernier/pod CDR<br>5. A93V, ktorý je obalový zvyšok a zvyšok vernierovej zóny<br>6. K94R, ktorý je kánonický zvyšok                                                                                                      |
| Poznámky k akceptoru        | 7. KABID 019230/Genbank ACC#S40342<br>8. Hu κ LC podskupina II<br>9. CDR z rovnakej kánonickej štruktúrnej skupiny ako donor (m3D6)<br>L1=trieda4<br>L2=trieda 1<br>L3=trieda1<br>10. Neznáma špecificita | 11. KABID045919/Genbank Acc#AF115110<br>12. Hu HC podskupina III<br>13. CDR z rovnakej kánonickej štruktúrnej skupiny ako donor (m3D6)<br>H1=trieda 1<br>H2=trieda3<br>14. Spoznáva kapsulárny polysacharid Neisseria meningitis |
| Akceptorná zárodočná línia  | 15. VH3-23                                                                                                                                                                                                | 16. A3 & A19                                                                                                                                                                                                                     |

Tabuľky 13 a 14 uvádzajú Kabatove číslovacie kľúče pre rozličné ľahké, resp. ťažké reťazce.

Tabuľka 13: Kľúč ku Kabatovmu číslovaniu ľahkého reťazca

MyšíA19

| <u>KAB</u> |           |            | <u>3D6</u> | <u>Ľudský</u> | <u>KABID</u>  | <u>Záro-</u><br><u>doč.</u> |                                           |
|------------|-----------|------------|------------|---------------|---------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| <u>č.</u>  | <u>č.</u> | <u>Typ</u> | <u>VL</u>  | <u>3D6</u>    | <u>019230</u> | <u>lína</u>                 | <u>Poznámka</u>                           |
| 1          | 1         | FR1        | Y          | Y             | D             | D                           | Zriedkavý<br>myší, môže sa<br>dotýkať CDR |
| 2          | 2         |            | V          | V             | I             | I                           | Kánonický/<br>kontakt s CDR               |
| 3          | 3         |            | V          | V             | V             | V                           |                                           |
| 4          | 4         |            | M          | M             | M             | M                           |                                           |
| 5          | 5         |            | T          | T             | T             | T                           |                                           |
| 6          | 6         |            | Q          | Q             | Q             | Q                           |                                           |
| 7          | 7         |            | T          | S             | S             | S                           |                                           |
| 8          | 8         |            | P          | P             | P             | P                           |                                           |
| 9          | 9         |            | L          | L             | L             | L                           |                                           |
| 10         | 10        |            | T          | S             | S             | S                           |                                           |
| 11         | 11        |            | L          | L             | L             | L                           |                                           |
| 12         | 12        |            | S          | P             | P             | P                           |                                           |
| 13         | 13        |            | V          | V             | V             | V                           |                                           |
| 14         | 14        |            | T          | T             | T             | T                           |                                           |
| 15         | 15        |            | I          | P             | P             | P                           |                                           |
| 16         | 16        |            | G          | G             | G             | G                           |                                           |
| 17         | 17        |            | Q          | E             | E             | E                           |                                           |
| 18         | 18        |            | P          | P             | P             | P                           |                                           |
| 19         | 19        |            | A          | A             | A             | A                           |                                           |
| 20         | 20        |            | S          | S             | S             | S                           |                                           |
| 21         | 21        |            | I          | I             | I             | I                           |                                           |
| 22         | 22        |            | S          | S             | S             | S                           |                                           |
| 23         | 23        |            | C          | C             | C             | C                           |                                           |
| 24         | 24        | CDR1       | K          | K             | R             | R                           |                                           |
| 25         | 25        |            | S          | S             | S             | S                           |                                           |
| 26         | 26        |            | S          | S             | S             | S                           |                                           |
| 27         | 27        |            | Q          | Q             | Q             | Q                           |                                           |
| 27A        | 28        |            | S          | S             | S             | S                           |                                           |
| 27B        | 29        |            | L          | L             | L             | L                           |                                           |



|     |    |      |   |   |   |   |                      |
|-----|----|------|---|---|---|---|----------------------|
| 27C | 30 |      | L | L | L | L |                      |
| 27D | 31 |      | D | D | H | H |                      |
| 27E | 32 |      | S | S | S | S |                      |
| 28  | 33 |      | D | D | N | N |                      |
| 29  | 34 |      | G | G | G | G |                      |
| 30  | 35 |      | K | K | Y | Y |                      |
| 31  | 36 |      | T | T | N | N |                      |
| 32  | 37 |      | Y | Y | Y | Y |                      |
| 33  | 38 |      | L | L | L | L |                      |
| 34  | 39 |      | N | N | D | D |                      |
| 35  | 40 | FR2  | W | W | W | W |                      |
| 36  | 41 |      | L | L | L | L | Pakovací zvy-<br>šok |
| 37  | 42 |      | L | L | L | L |                      |
| 38  | 43 |      | Q | Q | Q | Q |                      |
| 39  | 44 |      | R | K | K | K |                      |
| 40  | 45 |      | P | P | P | P |                      |
| 41  | 46 |      | G | G | G | G |                      |
| 42  | 47 |      | Q | Q | Q | Q |                      |
| 43  | 48 |      | S | S | S | S |                      |
| 44  | 49 |      | P | P | P | P |                      |
| 45  | 50 |      | K | Q | Q | Q |                      |
| 46  | 51 |      | R | R | L | L | Pakovací zvy-<br>šok |
| 47  | 52 |      | L | L | L | L |                      |
| 48  | 53 |      | I | I | I | I |                      |
| 49  | 54 |      | Y | Y | Y | Y |                      |
| 50  | 55 | CDR2 | L | L | L | L |                      |
| 51  | 56 |      | V | V | G | G |                      |
| 52  | 57 |      | S | S | S | S |                      |
| 53  | 58 |      | K | K | N | N |                      |
| 54  | 59 |      | L | L | R | R |                      |
| 55  | 60 |      | D | D | A | A |                      |
| 56  | 61 |      | S | S | S | S |                      |
| 57  | 62 |      | G | G | G | G |                      |

|    |    |      |   |   |   |   |
|----|----|------|---|---|---|---|
| 58 | 63 |      | V | V | V | V |
| 59 | 64 |      | P | P | P | P |
| 60 | 65 |      | D | D | D | D |
| 61 | 66 |      | R | R | R | R |
| 62 | 67 |      | F | F | F | F |
| 63 | 68 |      | T | S | S | S |
| 64 | 69 |      | G | G | G | G |
| 65 | 70 |      | S | S | S | S |
| 66 | 71 |      | G | G | G | G |
| 67 | 72 |      | S | S | S | S |
| 68 | 73 |      | G | G | G | G |
| 69 | 74 |      | T | T | T | T |
| 70 | 75 |      | D | D | D | D |
| 71 | 76 |      | F | F | F | F |
| 72 | 77 |      | T | T | T | T |
| 73 | 78 |      | L | L | L | L |
| 74 | 79 |      | K | K | K | K |
| 75 | 80 |      | I | I | I | I |
| 76 | 81 |      | S | S | S | S |
| 77 | 82 |      | R | R | R | R |
| 78 | 83 |      | I | V | V | V |
| 79 | 84 |      | E | E | E | E |
| 80 | 85 |      | A | A | A | A |
| 81 | 86 |      | E | E | E | E |
| 82 | 87 |      | D | D | D | D |
| 83 | 88 |      | L | V | V | V |
| 84 | 89 |      | G | G | G | G |
| 85 | 90 |      | L | V | V | V |
| 86 | 91 |      | Y | Y | Y | Y |
| 87 | 92 |      | Y | Y | Y | Y |
| 88 | 93 |      | C | C | C | C |
| 89 | 94 | CDR3 | W | W | M | M |
| 90 | 95 |      | Q | Q | Q | Q |
| 91 | 96 |      | G | G | A | A |
| 92 | 97 |      | T | T | L | L |

|      |     |     |   |   |   |   |
|------|-----|-----|---|---|---|---|
| 93   | 98  |     | H | H | Q | Q |
| 94   | 99  |     | F | F | T | T |
| 95   | 100 |     | P | P | P | P |
| 96   | 101 |     | R | R | R |   |
| 97   | 102 |     | T | T | T |   |
| 98   | 103 | FR4 | F | F | F |   |
| 99   | 104 |     | G | G | G |   |
| 100  | 105 |     | G | Q | Q |   |
| 101  | 106 |     | G | G | G |   |
| 102  | 107 |     | T | T | T |   |
| 103  | 108 |     | K | K | K |   |
| 104  | 109 |     | L | V | V |   |
| 105  | 110 |     | E | E | E |   |
| 106  | 111 |     | I | I | I |   |
| 106A | 112 |     | K | K | K |   |

Tabuľka 14. Kľúč ku Kabatovmu číslovaniu ťažkého reťazca

| <u>KAB</u> |           |            | <u>Myší</u> |               |               | <u>VH3-23</u>               |                 |
|------------|-----------|------------|-------------|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------|
|            |           |            | <u>3D6</u>  | <u>Ľudský</u> | <u>KABID</u>  | <u>Záro-</u><br><u>doč.</u> |                 |
| <u>č.</u>  | <u>č.</u> | <u>Typ</u> | <u>VH</u>   | <u>3D6 VH</u> | <u>045919</u> | <u>lína</u>                 | <u>Poznámka</u> |
| 1          | 1         | FR1        | E           | E             | E             | E                           |                 |
| 2          | 2         |            | V           | V             | V             | V                           |                 |
| 3          | 3         |            | K           | Q             | Q             | Q                           |                 |
| 4          | 4         |            | L           | L             | L             | L                           |                 |
| 5          | 5         |            | V           | L             | L             | L                           |                 |
| 6          | 6         |            | E           | E             | E             | E                           |                 |
| 7          | 7         |            | S           | S             | S             | S                           |                 |
| 8          | 8         |            | G           | G             | G             | G                           |                 |
| 9          | 9         |            | G           | G             | G             | G                           |                 |
| 10         | 10        |            | G           | G             | G             | G                           |                 |
| 11         | 11        |            | L           | L             | L             | L                           |                 |
| 12         | 12        |            | V           | V             | V             | V                           |                 |
| 13         | 13        |            | K           | Q             | Q             | Q                           |                 |
| 14         | 14        |            | P           | P             | P             | P                           |                 |
| 15         | 15        |            | G           | G             | G             | G                           |                 |
| 16         | 16        |            | A           | G             | G             | G                           |                 |
| 17         | 17        |            | S           | S             | S             | S                           |                 |
| 18         | 18        |            | L           | L             | L             | L                           |                 |
| 19         | 19        |            | K           | R             | R             | R                           |                 |
| 20         | 20        |            | L           | L             | L             | L                           |                 |
| 21         | 21        |            | S           | S             | S             | S                           |                 |
| 22         | 22        |            | C           | C             | C             | C                           |                 |
| 23         | 23        |            | A           | A             | A             | A                           |                 |
| 24         | 24        |            | A           | A             | A             | A                           |                 |
| 25         | 25        |            | S           | S             | S             | S                           |                 |
| 26         | 26        |            | G           | G             | G             | G                           |                 |
| 27         | 27        |            | F           | F             | F             | F                           |                 |
| 28         | 28        |            | T           | T             | T             | T                           |                 |

|     |    |      |   |   |   |   |                                        |
|-----|----|------|---|---|---|---|----------------------------------------|
| 29  | 29 |      | F | F | F | F |                                        |
| 30  | 30 |      | S | S | S | S |                                        |
| 31  | 31 | CDR1 | N | N | S | S |                                        |
| 32  | 32 |      | Y | Y | Y | Y |                                        |
| 33  | 33 |      | G | G | A | A |                                        |
| 34  | 34 |      | M | M | V | M |                                        |
| 35  | 35 |      | S | S | S | S |                                        |
| 36  | 36 | FR2  | W | W | W | W |                                        |
| 37  | 37 |      | V | V | V | V |                                        |
| 38  | 38 |      | R | R | R | R |                                        |
| 39  | 39 |      | Q | Q | Q | Q |                                        |
| 40  | 40 |      | N | A | A | A | Zriedkavý my-<br>ší, náhrádza<br>w/Hum |
| 41  | 41 |      | S | P | P | P |                                        |
| 42  | 42 |      | D | G | G | G | Zriedkavý my-<br>ší, náhrádza<br>w/Hum |
| 43  | 43 |      | K | K | K | K |                                        |
| 44  | 44 |      | R | G | G | G |                                        |
| 45  | 45 |      | L | L | L | L |                                        |
| 46  | 46 |      | E | E | E | E |                                        |
| 47  | 47 |      | W | W | W | W |                                        |
| 48  | 48 |      | V | V | V | V |                                        |
| 49  | 49 |      | A | A | A | A | kontakt<br>CDR/veneer                  |
| 50  | 50 | CDR2 | S | S | A | A |                                        |
| 51  | 51 |      | I | I | I | I |                                        |
| 52  | 52 |      | R | R | S | S |                                        |
| 52A | 53 |      | S | S | G | G |                                        |
| 53  | 54 |      | G | G | S | S |                                        |
| 54  | 55 |      | G | G | G | G |                                        |
| 55  | 56 |      | G | G | G | G |                                        |
| 56  | 57 |      | R | R | S | S |                                        |
| 57  | 58 |      | T | T | T | T |                                        |
| 58  | 59 |      | Y | Y | Y | Y |                                        |

|     |    |     |   |   |   |   |
|-----|----|-----|---|---|---|---|
| 59  | 60 |     | Y | Y | Y | Y |
| 60  | 61 |     | S | S | A | A |
| 61  | 62 |     | D | D | D | D |
| 62  | 63 |     | N | N | S | S |
| 63  | 64 |     | V | V | V | V |
| 64  | 65 |     | K | K | K | K |
| 65  | 66 |     | G | G | G | G |
| 66  | 67 | FR3 | R | R | R | R |
| 67  | 68 |     | F | F | F | F |
| 68  | 69 |     | T | T | T | T |
| 69  | 70 |     | I | I | I | I |
| 70  | 71 |     | S | S | S | S |
| 71  | 72 |     | R | R | R | R |
| 72  | 73 |     | E | D | D | D |
| 73  | 74 |     | N | N | N | N |
| 74  | 75 |     | A | A | A | S |
| 75  | 76 |     | K | K | K | K |
| 76  | 77 |     | N | N | N | N |
| 77  | 78 |     | T | S | S | T |
| 78  | 79 |     | L | L | L | L |
| 79  | 80 |     | Y | Y | Y | Y |
| 80  | 81 |     | L | L | L | L |
| 81  | 82 |     | Q | Q | Q | Q |
| 82  | 83 |     | M | M | M | M |
| 82A | 84 |     | S | N | N | N |
| 82B | 85 |     | S | S | S | S |
| 82C | 86 |     | L | L | L | L |
| 83  | 87 |     | K | R | R | R |
| 84  | 88 |     | S | A | A | A |
| 85  | 89 |     | E | E | E | E |
| 86  | 90 |     | D | D | D | D |
| 87  | 91 |     | T | T | T | T |
| 88  | 92 |     | A | A | A | A |
| 89  | 93 |     | L | L | L | V |
| 90  | 94 |     | Y | Y | Y | V |

|      |     |      |   |   |   |   |                                       |
|------|-----|------|---|---|---|---|---------------------------------------|
| 91   | 95  |      | Y | Y | Y | Y |                                       |
| 92   | 96  |      | C | C | C | C |                                       |
| 93   | 97  |      | V | V | A | A | Pakovací zvy-<br>šok, použi my-<br>ší |
| 94   | 98  |      | R | R | K | K | Kánonický,<br>použi myší              |
| 95   | 99  | CDR3 | Y | Y | D |   |                                       |
| 96   | 100 |      | D | D | N |   |                                       |
| 97   | 101 |      | H | H | Y |   |                                       |
| 98   | 102 |      | Y | Y | D |   |                                       |
| 99   | 103 |      | S | S | F |   |                                       |
| 100  | 104 |      | G | G | W |   |                                       |
| 100A | 105 |      | S | S | S |   |                                       |
| 100B | 106 |      | S | S | G |   |                                       |
| 100C | 107 |      | - | - | T |   |                                       |
| 100D | 108 |      | - | - | F |   |                                       |
| 101  | 109 |      | D | D | D |   |                                       |
| 102  | 110 |      | Y | Y | Y |   |                                       |
| 103  | 111 | FR4  | W | W | W |   |                                       |
| 104  | 112 |      | G | G | G |   |                                       |
| 105  | 113 |      | Q | Q | Q |   |                                       |
| 106  | 114 |      | G | G | G |   |                                       |
| 107  | 115 |      | T | T | T |   |                                       |
| 108  | 116 |      | T | L | L |   |                                       |
| 109  | 117 |      | V | V | V |   |                                       |
| 110  | 118 |      | T | T | T |   |                                       |
| 111  | 119 |      | V | V | V |   |                                       |
| 112  | 120 |      | S | S | S |   |                                       |
| 113  | 121 |      | S | S | S |   |                                       |

Humanizované protilátky výhodne prejavujú špecifickú väzbovú afinitu pre A $\beta$  aspoň  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  alebo  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Horný limit väzbovej afinity humanizovaných protilátok pre A $\beta$  je obyčajne trikrát, štyrikrát alebo päťkrát vyšší

ako limit pre 3D6 (t.j.  $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ). Dolný limit väzbovej afinity je tiež často trojnásobkom, štvornásobkom alebo päťnásobkom limitu pre 3D6.

*Zostrojenie a expresia humanizovaných 3D6 VH a VL, verzia 1.*

V stručnosti, syntetizovali sa 4 veľké jednoreťazcové prekrývajúce sa oligonukleotidy pre každú V oblasť. Okrem toho sa syntetizovali 4 krátke PCR priméry pre každú V oblasť, aby sa ďalej uľahčilo zostrojenie špecifickej V oblasti. DNA sekvencie oligonukleotidov použité na tento účel sú uvedené v tabuľke 15.

Tabuľka 15: Oligonukleotidy DNA

| DNA č. | Veľkosť | Kódovanie ? | Sekvencia                                                                                                                                                                                                | Komentáre    |
|--------|---------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4060   | 136     | Áno         | tccgc aagct tgccg ccacc<br>ATGGA CATGC GCGTG CCCGC<br>CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA<br>TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC<br>TCCGG CTACG TGGTG ATGAC<br>CCAGT CCCCC CTGTC CCTGC<br>CCGTG ACCCC CGGCG A<br>(SEQ ID NO: 17) | hum 3D6 VL-A |
| 4061   | 131     | Nie         | CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT<br>TCTGC AGCAG CCAGT TCAGG<br>TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC<br>CAGCA GGGAC TGGGA GGACT<br>TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC<br>TCGCC GGGGG TCACG GGCAG<br>GGACA GGGGG G<br>(SEQ ID NO: 18)       | hum 3D6 VL-B |
| 4062   | 146     | Áno         | ACCTG AACTG GCTGC TGCAG<br>AAGCC CGGCC AGTCC CCCCA<br>GCGCC TGATC TACCT GGTGT<br>CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG                                                                                                 | hum 3D6 VL-C |



|      |     |     |                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                         |
|------|-----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |     |     | CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC<br>CGGCT CCGGC ACCGA CTTC<br>CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG<br>GAGGC C (SEQ ID NO: 19)                                                                                                         |                                                                                                                         |
| 4063 | 142 | Nie | aattc tagga tccac tcacg<br>CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC<br>CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG<br>AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA<br>GTAGT ACACG CCCAC GTCCT<br>CGGCC TCCAC GCGGG AGATC<br>TTCAG GGTGA AGTCT GTGCC<br>GG (SEQ ID NO: 20) | hum 3D6 VL-D                                                                                                            |
| 4064 | 16  | Nie | CTGGG GGGAC TGGCC G<br>(SEQ ID NO: 21)                                                                                                                                                                          | hum 3D6 VL-A+B<br>Dozadu<br>% A+T = 18,75 [3];<br>% C+G = 81,2 [13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,96°C   |
| 4065 | 22  | Áno | ACCTG AACTG GCTGC TGCAG<br>AA (SEQ ID NO: 22)                                                                                                                                                                   | hum 3D6 VL-C+D<br>Dopredu<br>% A+T = 45,45 [10];<br>% C+G = 54,55[12]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 64,54°C |
| 4066 | 138 | Áno | acaga aagct tgccg ccacc<br>ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG<br>GCTTT TTCTT GTGGC TATTT<br>TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG<br>GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG<br>CGGCG GCCTG GTGCA GCCCG<br>GCGGC TCCCT GCGCC TGT<br>(SEQ ID NO: 23)      | hum 3D6 VH-A                                                                                                            |
| 4067 | 135 | Nie | GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG<br>CCACC CACTC CAGGC CCTTG<br>CCGGG GGCCT GGCGC ACCCA<br>GGACA TGCCG TAGTT GGAGA<br>AGGTG AAGCC GGAGG CGGCG<br>CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC                                                  | hum 3D6 VH-B                                                                                                            |

|      |     |     |                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                         |
|------|-----|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |     |     | GCCGG GCTGC ACCAG<br>(SEQ ID NO: 24)                                                                                                                                                                              |                                                                                                                         |
| 4068 | 142 | Áno | CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT<br>CCGCT CCGGC GCGGG CCGCA<br>CCTAC TACTC CGACA ACGTG<br>AAGGG CCGCT TCACC ATCTC<br>CCGCG ACAAC GCCAA GAACT<br>CCCTG TACCT GCAGA TGAAC<br>TCCCT GCGCG CCGAG GACAC<br>CG (SEQ ID NO: 25)   | hum 3D6 VH-C                                                                                                            |
| 4069 | 144 | Nie | ctgca aggat ccact caccG<br>GAGGA CACGG TCACC AGGGT<br>GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG<br>AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG<br>TAGCG CACGC AGTAG TACAG<br>GGCGG TGTCC TCGGC GCGCA<br>GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC<br>AGGG (SEQ ID NO: 26) | hum 3D6 VH-D                                                                                                            |
| 4070 | 16  | Nie | GCCGC CGGAG CGGAT G<br>(SEQ ID NO: 27)                                                                                                                                                                            | hum 3D6 VH-A+B<br>Dozadu<br>% A+T = 18,75 [3];<br>% C+G = 81,25 [13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,96°C  |
| 4071 | 20  | Áno | CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT<br>(SEQ ID NO: 28)                                                                                                                                                                        | hum 3D6 VH-C+D<br>Dopredu<br>% A+T = 35,00 [7];<br>% C+G = 65,00[13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,55°C  |
| 4072 | 19  | Áno | tcc gca agc ttg ccg cca<br>c (SEQ ID NO: 29)                                                                                                                                                                      | hum 3D6 VL-A+B<br>Dopredu<br>% A+T = 31,58 [6];<br>% C+G = 68,42 [13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,64°C |
| 4073 | 29  | Nie | aat tct agg atc cac tca<br>cgC TTG ATC TC<br>(SEQ ID NO: 30)                                                                                                                                                      | hum 3D6 VL-C+D<br>Dozadu<br>% A+T = 55,17 [16];<br>% C+G = 44,83 [13]                                                   |

|      |    |     |                                                      |                                                                                                                           |
|------|----|-----|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |    |     |                                                      | Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,04°C                                                                            |
| 4074 | 23 | Áno | aca gaa agc ttg ccg cca<br>ccA TG<br>(SEQ ID NO: 31) | hum 3D6 VH-A+B<br>Dopredu<br>% A+T = 43,48 [10];<br>% C+G = 56,52 [13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,33 °C |
| 4075 | 22 | Nie | ctg caa gga tcc act cac<br>cGG A<br>(SEQ ID NO: 32)  | hum 3D6 VH-C+D<br>Dozadu<br>% A+T = 40,91 [9];<br>% C+G = 59,09 [13]<br>Davis,Botstein,Roth<br>Teplota topenia 66,40 °C   |

Humanizovaný ľahký reťazec sa poskladal pomocou PCR. Analýza DNA sekvencie viac než dvoch tuctov klonov odhalila rozptýlené bodové mutácie a delécie pozdĺž VL oblasti s ohľadom na očakávanú sekvenciu. Analýza sekvencií ukázala, že klon 2.3 bol prístupný na opravu 2 priestorovo blízkych jednoduchých nukleotidových delécií v amino-koncovej oblasti. Preto sa vykonala lokálne orientovaná mutagenéza na klone pCRShum3D6v12.3 pomocou oligonukleotidov, aby sa zaviedli 2 vynechané nukleotidy, a oprava bodových mutácií sa potvrdila analýzou DNA sekvencie, po čom sa VL inzert naklonoval do expresného vektora ľahkého reťazca pCMV-cK.

Zostrojenie humanizovaného VH pomocou metód založených na PCR viedlo ku klonom s veľkými deléciami v 5' polovici sekvencie. Ďalšie snahy optimalizovať PCR podmienky sa stretli s čiastočným úspechom. Klony zostrojené za optimalizovaných PCR podmienok mali stále 10-20 nt delécie v oblasti mapujúcej prekrytie A+B fragmentov. Použila sa preto alternatívna stratégia na zostrojenie VH využívúc metódu rozšírenia prekrytia sprostredkovaného DNA polymerázou (T4, Klenow a Sequenase), po čom nasledovala T4 DNA ligáza na kovalentné spojenie prekrývajúcich sa koncov. Analýza DNA sekvencie podskupiny klonov získaných zo zostrojeného VH pomocou tohto druhého postupu ukázala rozptýlené bodové mutácie a delécie medzi klonmi. Analýza viac než dvoch tuctov klonov ukázala v podstate rovnaký obraz ako je ilustrované na týchto klonoch. Podobné výsledky, ktoré sa pozorovali po prvom

pokuse o zostrojenie klonov VH a VL naznačili, že pozorované chyby DNA sekvencie vznikli z chýb automatického syntezátora v priebehu syntézy dlhých DNA použitých na ich zostrojenie.

Humanizovaný VH klon 2.7 sa vybral na opravu lokálne orientovanou mutagenézou 3 nukleotidových delécií, ktoré podľa pozorovania tento klon obsahuje.

#### Príklad 8: Charakterizácia humanizovanej protilátky 3D6v2

Druhá verzia humanizovaného 3D6 sa vytvorila tak, že mala každú zo substitúcií naznačených pre verziu 1, okrem D->Y substitúcie na zvyšku 1. Substitúcia na tomto zvyšku sa uskutočnila vo verzii 1, pretože zvyšok sa identifikoval ako zvyšok interagujúci s CDR. Substitúcia však odstránila zvyšok, ktorý bol zriedkavý pre ľudské imunoglobulíny v tejto polohe. Preto sa vytvorila verzia bez substitúcie. Okrem toho nezárodočné zvyšky v rámcových oblastiach ťažkého reťazca sa substituovali zárodočnými zvyškami, menovite H74 = S, H77 = T a H89 = V. Kabatovo číslovanie pre ľahký a ťažký reťazec verzie 2 je rovnaké, ako je použité v tabuľkách 13, resp. 14, s tou výnimkou, že zvyšok 1 verzie 2 ľahkého reťazca je asp (D), zvyšok 74 ťažkého reťazca je ser (S), zvyšok 77 ťažkého reťazca je thr (T) a zvyšok 89 ťažkého reťazca je val (V). Sekvencie nukleotidov ľahkého a ťažkého reťazca humanizovaného 3D6 verzie 1 sú uvedené ako SEQ ID NO: 34, resp. 36. Sekvencie nukleotidov ľahkého a ťažkého reťazca humanizovaného 3D6 verzie 2 sú uvedené ako SEQ ID NO: 35, resp. 37.

#### Príklad 9: Funkčné skúšky humanizovaných 3D6 protilátok

*Väzba humanizovaného 3D6v1 k agregovanému A $\beta$ .* Funkčné skúšanie humanizovaného 3D6v1 sa vykonalo pomocou kondicionovaného média z dočasne transfektovaných COS buniek. Bunky sa transfektovali s plne chimérickou protilátkou, zmesou chimérický ťažký reťazec + humanizovaný ľahký reťazec.

zec alebo chimérický ľahký reťazec + humanizovaný ťažký reťazec, a napokon plne humanizovanou protilátkou. Kondicionované médium sa skúšalo na väzbu k agregovanému A $\beta$ 41-42 skúškou ELISA. Humanizovaná protilátka preukázala dobrú aktivitu v rámci experimentálnej chyby a prejavila väzbové vlastnosti nerozlíšiteľné od chimérickej 3D6 referenčnej vzorky. Výsledky sú uvedené v tabuľke 16.

Tabuľka 16:

| ng/ml | Chimérický | hu VH/ Ch VL | Ch VH/ Hu VL | Hu VH/ Hu VL |
|-------|------------|--------------|--------------|--------------|
| 690   |            |              | 0,867        |              |
| 600   |            |              |              | 0,895        |
| 260   | 0,83       |              |              |              |
| 230   |            |              | 0,774        |              |
| 200   |            |              |              | 0,81         |
| 190   |            | 0,811        |              |              |
| 87    | 0,675      |              |              |              |
| 77    |            |              | 0,594        |              |
| 67    |            |              |              | 0,689        |
| 63    |            | 0,648        |              |              |
| 29    | 0,45       |              |              |              |
| 25    |            |              | 0,381        |              |
| 22    |            |              |              | 0,496        |
| 21    |            | 0,438        |              |              |
| 9,6   | 0,251      |              |              |              |
| 8,5   |            |              | 0,198        |              |
| 7,4   |            |              |              | 0,278        |
| 7     |            | 0,232        |              |              |
| 3,2   | 0,129      |              |              |              |
| 2,3   |            | 0,124        |              |              |

Na porovnanie väzbových afínít humanizovaných protilátok 3D6v1 a 3D6v2 sa vykonala analýza ELISA s použitím agregovaného A $\beta$  ako antigénu. Výsledky ukázali, že 3D6v1 (H1L1) aj 3D6v2 (H2L2) mali temer identické väzbové vlastnosti (obrázok 5).

*Replacement NET (rNET) analýza h3D6v2.* Skúška na mapy epitopu rNET poskytuje informáciu o príspevku individuálnych zvyškov v epitope k celkovej väzbovej aktivite protilátky. Analýza rNET používa syntetické, systematicky jednoducho substituované analógy peptidov. Väzba skúšanej protilátky sa stanoví oproti prirodzenému peptidu (prirodzený antigén) a oproti 19 alternatívnym „jednoducho substituovaným“ peptidom, pričom každý peptid je substituovaný v prvej polohe jednou z 19 neprirodzených aminokyselín pre túto polohu. Vygeneruje sa profil odrážajúci účinok substitúcie v tejto polohe s rozličnými neprirodzenými zvyškami. Podobne sa vygenerujú profily v ďalších polohách pozdĺž peptidu antigénu. Kombinovaný profil alebo mapa epitopu (odrážajúca substitúciu v každej polohe všetkými 19 neprirodzenými zvyškami) sa potom môže porovnať s mapou generovanou podobným spôsobom pre druhú protilátku. V zásade podobné alebo identické mapy naznačujú, že porovnávané protilátky majú rovnakú alebo podobnú špecificitu epitopu.

Táto analýza sa vykonala pre 3D6 a humanizovaný 3D6, verziu 2. Protilátky sa skúšali na väzbu proti prirodzenému A $\beta$  peptidu DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:33). Zvyšky 1-8 sa systematicky substituovali každým z 19 neprirodzených zvyškov pre túto polohu. Podobne sa generovali mapy pre 3D6 a h3D6v2. Výsledky sú uvedené v tabuľkovej forme v tabuľke 17.

Tabuľka 17: A $\beta$ : replacement Net Epitope (rNET) mapovanie wt3D6 a humanizovaného 3D6

| Substitúcia  | Divoký typ 3D6 [OD] | Humanizovaný 3D6 [OD] | Substitúcia  | Divoký typ 3D6 [OD] | Humanizovaný 3D6 [OD] |
|--------------|---------------------|-----------------------|--------------|---------------------|-----------------------|
| Zvyšok 1 = A | 0,464               | 0,643                 | Zvyšok 5 = A | 0,275               | 0,435                 |
| C            | 0,450               | 0,628                 | C            | 0,359               | 0,635                 |
| D            | 0,577               | 0,692                 | D            | 0,080               | 0,163                 |
| E            | 0,576               | 0,700                 | E            | 0,115               | 0,187                 |
| F            | 0,034               | 0,062                 | F            | 0,439               | 0,569                 |
| G            | 0,569               | 0,738                 | G            | 0,485               | 0,679                 |

|                |       |       |                 |       |       |
|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| H              | 0,054 | 0,117 | H               | 0,577 | 0,680 |
| I              | 0,048 | 0,118 | I               | 0,510 | 0,671 |
| K              | 0,033 | 0,057 | K               | 0,573 | 0,693 |
| L              | 0,073 | 0,148 | L               | 0,517 | 0,691 |
| M              | 0,039 | 0,072 | M               | 0,418 | 0,611 |
| N              | 0,587 | 0,757 | N               | 0,476 | 0,655 |
| P              | 0,069 | 0,144 | P               | 0,093 | 0,198 |
| Q              | 0,441 | 0,689 | Q               | 0,388 | 0,565 |
| R              | 0,056 | 0,155 | R               | 0,613 | 0,702 |
| S              | 0,569 | 0,762 | S               | 0,487 | 0,633 |
| T              | 0,450 | 0,702 | T               | 0,530 | 0,639 |
| V              | 0,057 | 0,190 | V               | 0,493 | 0,562 |
| W              | 0,031 | 0,070 | W               | 0,393 | 0,461 |
| Y              | 0,341 | 0,498 | Y               | 0,278 | 0,230 |
| Zvyšok<br>2= A | 0,548 | 0,698 | Zvyšok<br>6 = A | 0,587 | 0,707 |
| C              | 0,553 | 0,694 | C               | 0,585 | 0,703 |
| D              | 0,119 | 0,222 | D               | 0,584 | 0,701 |
| E              | 0,563 | 0,702 | E               | 0,579 | 0,702 |
| F              | 0,577 | 0,717 | F               | 0,586 | 0,704 |
| G              | 0,527 | 0,720 | G               | 0,592 | 0,709 |
| H              | 0,534 | 0,741 | H               | 0,596 | 0,688 |
| I              | 0,522 | 0,722 | I               | 0,602 | 0,708 |
| K              | 0,548 | 0,722 | K               | 0,585 | 0,691 |
| L              | 0,482 | 0,705 | L               | 0,584 | 0,688 |
| M              | 0,535 | 0,705 | M               | 0,583 | 0,687 |
| N              | 0,525 | 0,735 | N               | 0,580 | 0,686 |
| P              | 0,445 | 0,707 | P               | 0,587 | 0,705 |
| Q              | 0,567 | 0,756 | Q               | 0,570 | 0,695 |
| R              | 0,562 | 0,719 | R               | 0,576 | 0,686 |
| S              | 0,587 | 0,705 | S               | 0,573 | 0,689 |
| T              | 0,552 | 0,712 | T               | 0,573 | 0,700 |
| V              | 0,550 | 0,702 | V               | 0,588 | 0,715 |
| W              | 0,553 | 0,701 | W               | 0,576 | 0,696 |

|                |       |       |                 |       |       |
|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| Y              | 0,547 | 0,704 | Y               | 0,595 | 0,708 |
| Zvyšok<br>3= A | 0,038 | 0,061 | Zvyšok<br>7 = A | 0,580 | 0,688 |
| C              | 0,222 | 0,410 | C               | 0,559 | 0,676 |
| D              | 0,019 | 0,027 | D               | 0,573 | 0,681 |
| E              | 0,542 | 0,689 | E               | 0,565 | 0,677 |
| F              | 0,034 | 0,060 | F               | 0,546 | 0,668 |
| G              | 0,016 | 0,019 | G               | 0,562 | 0,679 |
| H              | 0,016 | 0,020 | H               | 0,557 | 0,675 |
| I              | 0,019 | 0,024 | I               | 0,552 | 0,681 |
| K              | 0,053 | 0,090 | K               | 0,565 | 0,685 |
| L              | 0,019 | 0,026 | L               | 0,566 | 0,701 |
| M              | 0,019 | 0,027 | M               | 0,562 | 0,697 |
| N              | 0,024 | 0,032 | N               | 0,573 | 0,688 |
| P              | 0,017 | 0,020 | P               | 0,582 | 0,678 |
| Q              | 0,153 | 0,406 | Q               | 0,563 | 0,679 |
| R              | 0,015 | 0,023 | R               | 0,551 | 0,677 |
| S              | 0,016 | 0,021 | S               | 0,563 | 0,674 |
| T              | 0,015 | 0,019 | T               | 0,560 | 0,685 |
| V              | 0,016 | 0,021 | V               | 0,563 | 0,687 |
| W              | 0,149 | 0,304 | W               | 0,547 | 0,685 |
| Y              | 0,016 | 0,020 | Y               | 0,560 | 0,682 |
| Zvyšok<br>4= A | 0,016 | 0,020 | Zvyšok<br>8 = A | 0,573 | 0,687 |
| C              | 0,020 | 0,023 | C               | 0,583 | 0,700 |
| D              | 0,017 | 0,020 | D               | 0,586 | 0,697 |
| E              | 0,016 | 0,021 | E               | 0,601 | 0,701 |
| F              | 0,557 | 0,703 | F               | 0,586 | 0,687 |
| G              | 0,016 | 0,020 | G               | 0,569 | 0,681 |
| H              | 0,470 | 0,723 | H               | 0,559 | 0,683 |
| I              | 0,119 | 0,360 | I               | 0,568 | 0,686 |
| K              | 0,015 | 0,018 | K               | 0,557 | 0,698 |
| L              | 0,559 | 0,716 | L               | 0,570 | 0,686 |
| M              | 0,549 | 0,725 | M               | 0,571 | 0,693 |



|   |       |       |   |       |       |
|---|-------|-------|---|-------|-------|
| N | 0,085 | 0,089 | N | 0,573 | 0,700 |
| P | 0,030 | 0,056 | P | 0,574 | 0,694 |
| Q | 0,065 | 0,110 | Q | 0,590 | 0,703 |
| R | 0,016 | 0,019 | R | 0,589 | 0,699 |
| S | 0,026 | 0,031 | S | 0,599 | 0,719 |
| T | 0,016 | 0,021 | T | 0,586 | 0,689 |
| V | 0,213 | 0,494 | V | 0,578 | 0,688 |
| W | 0,291 | 0,568 | W | 0,567 | 0,687 |
| Y | 0,529 | 0,730 | Y | 0,574 | 0,680 |

Je pozoruhodné, že profily sú prakticky identické pre 3D6 a h3D6v2, keď sa pozeráme na substitúcie vo všetkých polohách (t.j. hodnoty sa menia identickým spôsobom, keď sa porovnajú údaje v stĺpci 1 (3D6) so stĺpcom 2 (h3D6v2)). Tieto údaje ukazujú, že špecificita h3D6v2 sa zachováva, pretože mapa epitopu h3D6v2 rNET je prakticky identická s m3D6, ak sa použijú zvyšky A $\beta$  1-4 aj 5-8.

*Imunohistochemia PDAPP mozgových rezov ukazuje špecificitu protilátky h3D6v1.* Humanizovaná 3D6v1 protilátka spozná A $\beta$  v kryostaticky pripravených mozgových rezoch z PDAPP myší. Humanizovaný 3D6v1 aj PK1614 sa viažu na PDAPP plaky s tým istým spôsobom odozvy na dávku, ako sa odmeralo množstvom fluorescencie (kvantifikovaného v pixeloch) na snímok oproti množstvu protilátky použitému na farbenie tkaniva (obrázok 6). V tomto experimente sa použili identické anti-humánne sekundárne protilátky. Príprava rezov, farbenie a príprava obrazov sa už skôr opísali. Analýza obrazov h3D6v2 farbenia na rezoch PDAPP a AD mozgov v identických experimentoch ukázali, že h3D6v2 spozná A $\beta$  plaky podobným spôsobom ako 3D6v1 (napr. silne zasiahnuté plaky).

*Kompetičná väzbová analýza h3D6.* Schopnosť h3D6 protilátok v1 a v2 súperiť s myším 3D6 sa merala metódou ELISA pomocou biotinylovanej 3D6 protilátky. Kompetičná väzbová analýza zistila, že h3D6v1, h3D6v2 a chimérický PK1614 môžu súperiť s m3D6 vo väzbe s A $\beta$  (obrázok 7). h3D6v1 a h3D6v2 boli identické v schopnosti súperiť s 3D6 voči A $\beta$ . Protilátka 10D5sa

použila ako negatívna kontrola, pretože má odlišný väzbový epitop než 3D6. Analýza BIAcore tiež ukázala vysokú afinitu h3D6v1 a h3D6v2 pre A $\beta$  (tabuľka 18).

Tabuľka 18: Merania afínít A $\beta$  protilátok pomocou BIAcore technológie

| Protilátka     | ka1 (1/Ms) | kd1 (1/s) | Kd (nM) |
|----------------|------------|-----------|---------|
| Mu 3D6         | 4,06E+05   | 3,57E-04  | 0,88    |
| Chimérický 3D6 | 4,58E+05   | 3,86E-04  | 0,84    |
| Hu 3D6v1       | 1,85E+05   | 3,82E-04  | 2,06    |
| Hu 3D6v2       | 1,70E+05   | 3,78E-04  | 2,24    |

V porovnaní s 3D6, ktorý má Kd 0,88 nM, h3D6v1 aj h3D6v2 mali asi 2-krát až 3-krát menšiu väzbovú afinitu, nameranú ako 2,06 nM a 2,24 nM pre h3D6v1, resp. h3D6v2. Kompetičná väzbová skúška ELISA ukázala približne 6-krát nižšiu väzbovú afinitu pre h3D6v1 a h3D6v2. Humanizované protilátky obvykle strácajú asi 3- až 4-násobok väzbovej afinity v porovnaní k ich myším protějškam. Asi trojnásobný úbytok (priemer výsledkov ELISA a BIAcore) pre h3D6v1 a h3D6v2 je teda v uznávanom rozmedzí.

*Skúška ex vivo pomocou h3D6v2 protilátky.* Schopnosť h3D6v2 stimulovať mikrogliálne bunky sa skúšala pomocou fagocytóznejskúšky *ex vivo* (obrázok 8). h3D6v2 bol rovnako účinný ako chimérický 3D6 pri indukcii fagocytózy agregátov A $\beta$  z mozgového tkaniva PDAPP myši. Ako negatívna kontrola sa v tomto experimente použil IgG, pretože nie je schopný viazať sa na A $\beta$ , a preto nemôže vyvolať fagocytózu.

*Mozgová lokalizácia h3D6 in vivo.* Každá z nasledujúcich protilátok, <sup>125</sup>I značkované h3D6v2, m3D6 a protilátka DAE13, sa intravenózne podali 14 individuálnym PDAPP myšiam v samostatných experimentoch. Myši sa utrtili po 7 dňoch a perfundovali sa pre ďalšiu analýzu. Oblasti ich mozgov sa rozobrali a merali na aktivitu <sup>125</sup>I v špecifických oblastiach mozgu. Aktivita rádioaktívnej značky v mozgu sa porovnala s aktivitou vo vzorkách séra. Výsledky pre sérum, resp. pre oblasti mozgu sú uvedené v tabuľkách 19 a 20.

Tabuľka 19

| m3D6    | DAE13   | Hu3D6   |
|---------|---------|---------|
| 30389,1 | 17463,9 | 40963,8 |
| 12171   | 13200,6 | 24202,2 |
| 3418,2  | 36284,7 | 12472,4 |
| 18678,9 | 421,3   | 33851,8 |
| 27241   | 19702   | 27187,3 |
| 26398,8 | 24855,8 | 29016,9 |
| 27924,8 | 29287,4 | 33830,7 |
| 12008,4 | 12733,1 | 26734,9 |
| 29487,8 | 27722,5 | 30144,5 |
| 25498,6 | 30460,7 | 35126,9 |
| 9652    | 23320,1 | 28414,8 |
| 24599,3 | 7119,1  | 16956,1 |
| 29240   | 28093,5 | 18190,7 |
| 11922,7 | 24659,7 | 25671,4 |
| 17443,1 | 26748,9 |         |

Tabuľka 20

| m3D6   |        |        | DAE13  |        |         | Hu3D6 (H2L2) |        |         |
|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------------|--------|---------|
| cereb  | kort   | hipok  | cereb  | kort   | hipok   | cereb        | kort   | hipok   |
| 1991,9 | 1201,1 | 4024   | 1277,5 | 2522,9 | 5711,9  | 2424,6       | 3759,4 | 11622   |
| 238,9  | 746,1  | 2523   | 502,5  | 2123,5 | 6965,8  | 1509,8       | 2274,9 | 7018,2  |
| 645,9  | 603    | 1241,1 | 2325   | 3528,2 | 7801,6  | 500          | 2265,9 | 5316,3  |
| 1000   | 2508,2 | 4644,2 | 232,7  | 849,8  | 1891,9  | 2736,2       | 5703,7 | 10395,5 |
| 1266,9 | 3737,9 | 7975,8 | 891,6  | 2621   | 8245,2  | 1192,2       | 3188   | 10170   |
| 1422   | 2398,7 | 7731,1 | 1102,6 | 2087,5 | 7292,3  | 2269,4       | 3481,4 | 9621,6  |
| 1700,4 | 2154,4 | 7124,1 | 1650,6 | 3488,4 | 10284,8 | 1526,7       | 3028   | 8331,3  |
| 542,5  | 812,4  | 2456,8 | 712,9  | 2318,5 | 6643,3  | 1538,1       | 4194,1 | 11244,8 |
| 1309   | 3010,5 | 8693,5 | 1172,9 | 1953,6 | 7363    | 1245,7       | 1699,4 | 6831,2  |
| 1372,2 | 997,5  | 2425,4 | 1067,9 | 3697,2 | 12280,7 | 2708,8       | 2789   | 7887,4  |
| 778,6  | 1291,9 | 5654,4 | 1952,2 | 2120,7 | 6412,7  | 2251,3       | 3897,5 | 11121,5 |
| 1199,3 | 1683,4 | 4887,3 | 1005,2 | 1852,5 | 5121,4  | 1529,6       | 1772,2 | 7986,9  |

|        |        |        |       |        |         |        |        |        |
|--------|--------|--------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|
| 1021,8 | 3234,5 | 8036,2 | 961,5 | 3382,9 | 8473,1  | 644,1  | 1663,4 | 5056,5 |
| 742,1  | 1056,7 | 3405,2 | 852,3 | 1943,2 | 6717,4  | 1516,4 | 1620,6 | 9888   |
| 1273,7 | 1320,8 | 4262,6 | 997,5 | 3065,7 | 10213,1 |        |        |        |

Údaje ukazujú, že h3D6v2 sa zhromažďuje v mozgu a zvlášť bola koncentrovaná v hipokampálnej oblasti, o ktorej je známe, že sa v nej zhlučuje A $\beta$ . Počty impulzov v mozgu pre m3D6 a DAE13 boli porovnateľné s h3D6v2. Všetky tri protilátky boli schopné prekonávať hematoencefalitickú bariéru, ako je to vidieť z väzby na A $\beta$  plaky *in vivo*.

#### Príklad X. Klonovanie a sekvenovanie myších 10D5 variabilných oblastí

*Klonovanie a analýza sekvencie 10D5 VH.* Oblasti VH a VL 10D5 z hybridomových buniek sa klonovali RT-PCR pomocou 5'RACE postupov. Sekvencia nukleotidov (SEQ ID NO:13) a vydedukovaná sekvencia aminokyselín (SEQ ID NO:14) odvodená z dvoch nezávislých klonov cDNA kódujúcich predpokladanú 10D5 VL doménu sú uvedené v tabuľke 21 a na obrázku 9. Sekvencia nukleotidov (SEQ ID NO:15) a vydedukovaná sekvencia aminokyselín (SEQ ID NO:16) odvodená z dvoch nezávislých klonov cDNA kódujúcich predpokladanú 10D5 VH doménu sú uvedené v tabuľke 22 a na obrázku 10. Sekvencie 10D5 VL a VH spĺňajú kritériá pre funkčné V oblasti do takej miery, že obsahujú spojitý ORF z iniciátorového metionínu k C-oblasti a majú rovnaké konzervatívne zvyšky charakteristické pre gén V oblasti imunoglobulínu.

#### Tabuľka 21: Sekvencia myšej 10D5 VL DNA

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGA  
 TGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA  
 TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG  
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT  
 TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGA

CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEQ ID NO:13)

\*Leader peptid je podčiarknutý

Tabuľka 22: Sekvencia myšej 10D5 VH DNA

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA  
 GGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA  
 CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGAGTGAGCTGGATTCGT  
 CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCG  
 CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGG  
 TATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTCGA  
 AGGCCCATTA TACTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT  
 CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:15)

\*Leader peptid je podčiarknutý

#### Príklad XI. Prevencia a liečba ľudských pacientov

Na určenie bezpečnosti u ľudí sa uskutočnila fáza I skúšky s jednou dávkou. Terapeutické činidlo sa podáva pri zvyšujúcom sa dávkovaní rozličným pacientom vychádzajúc asi z 0,01 násobku hladiny očakávanej účinnosti a zvyšuje sa po trojnásobkoch, až kým sa dosiahne asi 10-násobok účinnej hladiny pre myši.

Na určenie terapeutickkej účinnosti sa vykoná fáza II skúšky. Vyberú sa pacienti v počiatočnom alebo v miernom štádiu Alzheimerovej choroby definovanom kritériami Asociácie pre Alzheimerovu chorobu a pre príbuzné ochorenia (ADRDA) pre pravdepodobnú AD. Vhodní pacienti dosahujú skóre v roz-

medzí 12-26 v mini-mentálnej štátnej skúške (MMSE). Ďalšie výberové kritériá sú, že pacient pravdepodobne nezomrie do skončenia skúšky a že nie sú prítomné komplikujúce problémy, ako je sprievodná liečba, ktorá môže interferovať. Vyhodnotenie základnej línie funkcií pacienta sa robí pomocou klasických psychometrických mier, ako sú MMSE a ADAS, ktorá je úplnou stupnicou na vyhodnotenie pacientov so stavom a funkčnosťou Alzheimerovej choroby. Tieto psychometrické stupnice sú meradlom progresie Alzheimerovho stavu. Na sledovanie liečby sa môžu tiež použiť vhodné miery kvality života. Progresia choroby sa môže tiež sledovať pomocou MRI. Môžu sa tiež sledovať krvné profily pacientov pomocou skúšok protilátok špecifických na imunogén alebo odozvami T buniek.

Po meraniach základnej línie začnú pacienti dostávať liečbu. Sú náhodne rozdelení a liečení buď terapeutickým činidlom alebo placebom v slepom pokuse. Pacienti sa sledujú zakaždým aspoň šesť mesiacov. Účinnosť sa stanoví ako významné spomalenie progresie v liečenej skupine v porovnaní so skupinou liečenou placebom.

V druhej skúške fázy II sa vyhodnotí konverzia pacientov z počiatočného štádia straty pamäte iného typu ako Alzheimerova choroba, ktorá sa niekedy označuje ako porucha pamäte súvisiaca s vekom (AAMI) alebo mierna kognitívna porucha (MCI), na pravdepodobnú Alzheimerovu chorobu, ako je definovaná kritériami ADRDA. Pacienti s vysokým rizikom konverzie na Alzheimerovu chorobu sa vyberú z neklinickej populácie pomocou skríningu referenčných populácií na počiatočné znaky straty pamäte alebo iné ťažkosti spojené s predalzheimerovskou symptomatológiou, rodinnou históriou Alzheimerovej choroby, genetickými rizikovými faktormi, vekom, pohlavím a inými znakmi, o ktorých sa zistilo, že predikujú vysoké riziko vzniku Alzheimerovej choroby. Vyhodnotí sa skóre základnej línie vhodných parametrov, ako sú MMSE a ADAS, spolu s inými parametrami navrhnutými na vyhodnotenie bežnejšej populácie. Tieto populácie pacientov sa rozdelia do vhodných skupín, v ktorých sa porovnáva placebo s rozličnými možnosťami dávkovania liečiva. Tieto populácie pacientov sa sledujú v intervaloch asi šesť mesiacov a konečný výsle-

dok pre každého pacienta je údaj, či konvertuje na konci pozorovania na pravdepodobnú Alzheimerovu chorobu, ako je definovaná kritériami ADRDA.

## Všeobecné materiály a metódy

### A. Príprava polyklonálnych a monoklonálnych A $\beta$ protilátok

Anti-A $\beta$  polyklonálna protilátka sa pripravila z krvi odobratej z dvoch skupín zvierat. Prvú skupinu tvorilo 100 samičích myší Swiss Webster vo veku 6 až 8 týždňov. V nultý, 15. a 29. deň boli imunizované 100  $\mu$ g AN1792 kombinovaného s CFA/IFA. Štvrtú injekciu dostali 36. deň s polovičnou dávkou AN1792. Pri utratení v 42. deň sa zvieratá nechali vykrváčať, pripravilo sa sérum a séra sa spojili, čím sa ho získalo celkove 64 ml. V druhej skupine bolo 24 samičích myší izogenických z PDAPP myšami, ale nie transgenických pre ľudský APP gén, starých 6 až 9 týždňov. Imunizovali sa v nultý, 14., 28. a 56. deň 100  $\mu$ g AN1792 kombinovaného s CFA/IFA. Tieto zvieratá sa tiež nechali vykrváčať pri utratení na 63. deň, pripravilo sa sérum a spojením sa získalo 14 ml séra. Tieto dve dávky séra sa spojili. Protilátková frakcia sa prečistila postupne dvoma zrážacími cyklami 50% nasýteným roztokom síranu amónneho. Výsledná zrazenina sa dialyzovala oproti PBS a skúšala sa na endotoxín. Hladina endotoxínu bola menšia než 1 EU/mg.

Anti-A $\beta$  monoklonálne protilátky sa pripravili z tekutiny ascitu. Tekutina sa najprv zbavila lipidov pridaním koncentrovaného dextránsulfátu sodného k ľadovej tekutine ascitu pri miešaní v ľade, kým sa dosiahla konečná koncentrácia 0,238 %. Potom sa pridával za miešania koncentrovaný CaCl<sub>2</sub>, až sa dosiahla konečná koncentrácia 64 mM. Tento roztok sa odstredil pri 10 000 x g a peleta sa odstránila. Supernatant sa miešal na ľade s rovnakým objemom nasýteného síranu amónneho pridávaného po kvapkách. Roztok sa znova odstredil pri 10 000 x g a supernatant sa odstránil. Peleta sa resuspendovala a dialyzovala sa proti 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl pri pH 7,5. Táto frakcia sa naniesla na stĺpec Pharmacia FPLC Sepharose Q a eluovala sa s reverzným gradientom od 0,4 M do 0,275 M NaCl v 20 mM Tris-HCl pri pH 7,5. Pík protilátky sa identifikoval absorbanciou pri 280 nm a vhodné frakcie sa spojili. Prečistený

preparát protilátky sa charakterizoval meraním koncentrácie proteínu pomocou metódy BCA a čistota pomocou SDS-PAGE. Zásobný roztok sa tiež skúšal na endotoxín. Hladina endotoxínu bola menšia než 1 EU/mg. Titrom menším než 100 sa na základe dohody priradila hodnota titra 25.

### B. Meranie titrov protilátky

Myšiam sa odobrala krv pomocou malého zárezu na chvostovej žile a do mikroodstredivkovej kyvety sa zachytilo asi 200  $\mu$ l krvi. Morčatám sa odobrala krv tak, že sa najprv oholili na zadnej časti päty a potom pomocou ihly č. 18 sa prepichla metatarzálna žila a odobrala sa krv do mikroodstredivkovej kyvety. Krv sa nechala zrážať jednu hodinu pri teplote miestnosti (RT), premiešala sa a potom sa odstredžovala 10 minút pri 14 000 x g, aby sa oddelila zrazenina od séra. Sérum sa potom prenieslo do čistej mikroodstredivkovej kyvety a skladovalo sa pri 4 °C, kým sa netitrovalo.

Titre protilátky sa merali metódou ELISA. Na 96-jamkové mikrotitrovacie misky (misky Costar EIA) sa nanieslo 100  $\mu$ l roztoku obsahujúceho buď 10  $\mu$ g/ml A $\beta$ 42 alebo SAPP alebo iných antigénov, ako je to uvedené v každej z príslušných správ, a udržiavali sa pri RT cez noc. Jamky sa odsali a do jamiek sa pridali séra začínajúc pri zriedení 1/100 vo vzorkovom riedidle (Specimen Diluent) (0,014 M fosforečnan sodný, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,6 % hovädzieho sérového albumínu, 0,05 % timerosalu). Sedem sérií zriedení vzorky sa pripravilo priamo v miskách v troch krokoch, aby sa dosiahlo konečné zriedenie 1/218700. Zriedené roztoky sa inkubovali v jamkách pokrytej misky jednu hodinu pri RT. Misky sa potom opláchli štyrikrát PBS obsahujúcim 0,05 % Tween 20. K jamkám sa pridala druhá protilátka, kozí anti-myší Ig konjugovaný s chrenovou peroxidázou (získaný od firmy Boehringer Mannheim), ako 100  $\mu$ l roztoku v zriedení 1/3000 vo vzorkovom riedidle a inkuboval sa jednu hodinu pri RT. Misky sa opäť opláchli štyrikrát PBS s Tween 20. Na vyvolanie chromogénu sa do každej jamky pridalo 100  $\mu$ l Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidínu získaného od firmy Pierce Chemicals) a inkubovali sa 15



minút pri RT. Reakcia sa zastavila prídavkom 25  $\mu$ l 2M  $H_2SO_4$ . Farebná intenzita sa potom odčítala na Molecular Devices Vmax pri (450 nm - 650 nm).

Titre boli definované ako prevrátená hodnota zriedenia séra, ktorá poskytla polovicu maxima OD. Maximálne OD sa väčšinou získalo z východiskového zriedenia 1/100, okrem prípadov s veľmi vysokými titrami, v ktorých bolo potrebné vyššie východiskové zriedenie na dosiahnutie maximálneho OD. Ak 50%-ný bod padol medzi dve zriedenia, na výpočet konečného titra sa urobila lineárna extrapolácia. Pri výpočte geometrického priemeru titrov protilátky sa titrom menším než 100 na základe dohody priradila hodnota titra 25.

### C. Príprava mozgového tkaniva

Po eutanázii sa mozgy vybrali a jedna hemisféra sa pripravila na imuno-histochemickú analýzu, kým z druhej hemisféry sa oddelili tri oblasti mozgu (hipokampus, kortex a cerebellum) a použili sa na meranie koncentrácie rozličných A $\beta$  proteínov a APP foriemi pomocou špecifických metód ELISA (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie).

Tkanivá určené na ELISA sa homogenizovali v 10 objemoch ľadového guanidínového tlmivého roztoku (5,0 M guanidín-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Homogenáty sa mierne miešali tri až štyri hodiny pri RT na Adamsovom nutátore (Fischer) a pred kvantifikáciou A $\beta$  a APP sa uchovávali pri -20 °C. Prechádzajúce experimenty ukázali, že pri týchto podmienkach uchovávania boli analyty stabilné a že syntetický A $\beta$  proteín (Bachem) sa dal kvantitatívne získať, keď sa napichal do homogenátu kontrolného mozgového tkaniva z myší toho istého vrhu (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie).

### D. Meranie hladín A $\beta$

Mozgové homogenáty sa zriedili 1 : 10 s ľadovým kazeínovým riedidlom (Casein Diluent) (0,25 % kazeínu, PBS, 0,05 % azidu sodného, 20  $\mu$ g/ml aprotinínu, 5 mM EDTA pH 8,0, 10  $\mu$ g/ml leupeptínu) a odstredžovali sa 20 min. pri

16 000 x g a pri 4 °C. Pripravili sa štandardy A $\beta$  proteínu (aminokyseliny 1-42) a APP štandardy, pričom výsledná zmes obsahovala 0,5 M guanidín a 0,1 % hovädzieho sérového albumínu (BSA). Sendvičová ELISA na „celkový“ A $\beta$  využíva monoklonálnu protilátku 266 špecifickú na aminokyseliny A $\beta$  13-28 (Seubert a kol., pozri vyššie) ako záchytnú protilátku, a biotinylovanú monoklonálnu protilátku 3D6 špecifickú na aminokyseliny A $\beta$  1-5 (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie) ako reportérsku protilátku. Monoklonálna protilátka 3D6 nepoznala vylučovaný APP alebo APP úplnej dĺžky, ale detegovala len typy A $\beta$  s amino-koncovou kyselinou asparágovou. Táto skúška mala dolnú hranicu citlivosti ~50 ng/ml (11 nM) a nepreukázala žiadnu krížovú reaktivitu k endogénnemu myšiemu A $\beta$  proteínu pri koncentráciách až do 1 ng/ml (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie).

Sendvičová ELISA špecifická na A $\beta$ 1-42 používa ako záchytnú protilátku mA $\beta$  21F12, ktorý je špecifický na aminokyseliny A $\beta$  33-42 (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie). V tejto skúške je tiež reportérska protilátka biotinylovaný mA $\beta$  3D6, ktorý má dolnú hranicu citlivosti asi 125  $\mu$ g/ml (28  $\mu$ M, Johnson-Wood a kol., pozri vyššie). Na A $\beta$  ELISY sa 100  $\mu$ l buď mA $\beta$  266 (s koncentráciou 10  $\mu$ g/ml) alebo mA $\beta$  21F12 (s koncentráciou 5  $\mu$ g/ml) nanieslo do jamiek 96-jamkových imunoscúšobných misiek (Costar) inkubáciou cez noc pri RT. Roztoky sa odstránili odsatím a jamky sa zablokovali aspoň na 1 hodinu pri RT prídavkom 200  $\mu$ l 0,25 % ľudského sérového albumínu v tlmivom roztoku PBS. Blokujúci roztok sa odstránil a misky sa pred použitím uchovávali vysušené pri 4 °C. Misky sa pred použitím rehydrovali vlhčiacim tlmivým roztokom (Wash Buffer) [Soľný roztok tlmivý Tris (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5) plus 0,05 % Tween 20]. Pridali sa vzorky a štandardy v troch alikvótnych dávkach po 100  $\mu$ l na jamku a inkubovali sa cez noc pri 4 °C. Po každom kroku skúšky sa misky opláchli aspoň trikrát vlhčiacim tlmivým roztokom. Pridal sa biotinylovaný mA $\beta$  3D6 zriedený na 0,5  $\mu$ g/ml v kazeínovom skúšobnom tlmivom roztoku (Casein Assay Buffer) (0,25 % kazeínu, PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) a inkuboval sa v jamkách 1 hodinu pri RT. Pridal sa konjugát avidínchrenová peroxidáza (Avidín-HPR sa získal od firmy Vector, Burlingame, CA) zriedený v pomere 1 : 4000 v kazeínovom skúšobnom tlmivom roztoku a nechal sa reagovať 15 minút pri RT, po čom sa enzymatická reakcia zastavila prídáním

25  $\mu$ l 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Reakčný produkt sa kvantifikoval pomocou Molecular Devices Vmax merajúcim rozdiel absorbancií pri 450 nm a 650 nm.

### E. Meranie hladín APP

Použili sa dve rozdielne skúšky na APP. Prvá, označená ako APP- $\alpha$ /FL, spoznáva APP-alfa ( $\alpha$ ) formu APP aj APP s úplnou dĺžkou. Druhá skúška je špecifická na APP- $\alpha$ . Skúška APP- $\alpha$ /FL spozná vylučovaný APP obsahujúci prvých 12 aminokyselín A $\beta$ . Pretože reportérska protilátka (2H3) nie je špecifická na miesto  $\alpha$ -pripojenia nachádzajúce sa medzi aminokyselinami 612-613 APP<sup>695</sup> (Esch a kol., *Science* 248:1122-1124 (1990)), táto skúška tiež spozná APP úplnej dĺžky (APP-FL). Predbežné experimenty, ktoré využívajú imobilizované APP protilátky k cytoplazmatickému chvostu APP-FL na odstránenie APP-FL z mozgových homogenátov, naznačujú, že približne 30 - 40 % APP- $\alpha$ /FL APP je FL (údaje tu nie sú uvedené). Záchytná protilátka na skúšky APP- $\alpha$ /FL aj na APP- $\alpha$  je mAb 8E5 vytvorená proti aminokyselinám 444 až 592 APP<sup>695</sup> formy (Games a kol., pozri vyššie). Reportérska mAb pre skúšku na APP- $\alpha$ /FL je mAb 2H3 špecifická na aminokyseliny 597-608 APP<sup>695</sup> (Johnson-Wood a kol., pozri vyššie) a reportérska protilátka pre skúšku na APP- $\alpha$  je biotinylovaný derivát mAb 16H9 vytvorený k aminokyselinám 605 až 611 APP. Dolná hranica citlivosti skúšky na APP- $\alpha$ /FL je asi 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood a kol.) a dolná hranica pre APP- $\alpha$  špecifickú skúšku je 22 ng/ml (0,3 nM). Na obidve APP skúšky sa naniesol do jamiek 96-jamkových EIA misky mAb 8E5, ako je to opísané pre mAb 266. Ako referenčný štandard pre APP- $\alpha$  skúšku a pre APP- $\alpha$ /FL skúšku sa použil prečistený rekombinantný, sekreciou získaný APP- $\alpha$  (Esch a kol., pozri vyššie). Vzorky mozgového homogenátu v 5 M guanidíne sa zriedili v pomere 1:10 v vzorkovom riedidle ELISA (ELISA Specimen Diluent) (0,014 M fosfátový tlmivý roztok, pH 7,4, 0,6 % hovädzieho sérového albumínu, 0,05 % timerosalu, 0,5 M NaCl, 0,1 % NP40). Potom sa zriedili v pomere 1:4 vo vzorkovom riedidle obsahujúcom 0,5 M guanidín. Zriedené homogenáty sa odstredovali 15 sekúnd pri 16 000 x g a pri RT. Na miskú sa pridali APP štandardy a vzorky v dvoch alikvótnych dávkach a inkubovali sa 1,5 hodiny pri RT. Biotinylovaná reportérska protilátka 2H3 alebo

16H9 sa inkubovala so vzorkami 1 hodinu pri RT. Streptavidín-alkalická fosfatáza (Boehringer Mannheim) zriedená v pomere 1 : 1000 vo vzorkovom riedidle sa inkubovala 1 hodinu v jamkách pri RT. Pridal sa fluorescenčný substrát 4-metyl-umbelliferylfosfát na 30-minútovú inkubáciu a misky sa odčítali na fluorimetri Cytofluor tm 2350 (Millipore) pri 365 nm excitácii a 450 nm emisii.

#### F. Imunohistochemia

Mozgy sa fixovali 3 dni pri 40 °C v 4% paraformaldehyde v PBS a do rozdeľovania sa uchovávali jeden až sedem dní pri 4 °C v 1% paraformaldehyde v PBS. Na vibratóme sa narezali 40 mikrometrov hrubé rezy a pred imunohistochemickým spracovaním sa uchovávali v kryoprotektante (30 % glycerolu, 30 % etylénglykolu vo fosfátovom tlmivom roztoku) pri 20 °C. Z každého mozgu sa inkubovalo cez noc šesť rezov na úrovni dorzálneho hipokampu získaných vo vzdialenostiach 240 µm od seba s nasledujúcimi protilátkami: (1) biotinylovaný anti-Aβ (mAb, 3D6, špecifický na ľudský Aβ) zriedený na koncentráciu 2 µg/ml v PBS a 1% konskom sére; alebo (2) biotinylovaný mAb špecifický na ľudský APP, 8E5, zriedený na koncentráciu 3 µg/ml v PBS a 1,0 % konskom sére; alebo (3) mAb špecifický na gliálny fibrilárny acidický proteín (GFAP; Sigma Chemical Co.) zriedený v pomere 1 : 500 0,25 % Tritonom X-100 a 1% konským sérom v soľnom roztoku tlmenom Tris, pH 7,4 (TBS); alebo (4) mAb špecifický na CD11b, MAC-1 antigén (Chemicon International) zriedený v pomere 1 : 100 0,25% Tritonom X-100 a 1% králičím sérom v TBS; alebo (5) mAb špecifický pre MHC II antigén (Pharmlingen) zriedený v pomere 1 : 100 0,25% Tritonom X-100 a 1% králičím sérom v TBS; alebo (6) potkaní mAb špecifický na CD 43 (Pharmlingen) zriedený v pomere 1 : 100 1% králičím sérom v PBS; alebo (7) potkaní mAb špecifický na CD 45RA (Pharmlingen) zriedený v pomere 1 : 100 1% králičím sérom v PBS; alebo (8) potkaní monoklonálny Aβ špecifický na CD 45RB (Pharmlingen) zriedený v pomere 1 : 100 1% králičím sérom v PBS; alebo (9) potkaní monoklonálny Aβ špecifický na CD 45 (Pharmlingen) zriedený v pomere 1 : 100 1% králičím sérom v PBS; alebo (10) biotinylovaný polyklonálny škrečí Aβ špecifický na CD3e (Pharmin-

gen) zriedený v pomere 1 : 100 1% králičím sérom v PBS ; alebo (11) potkaní mAb špecifický na CD3 (Serotec) zriedený v pomere 1 : 200 1% králičím sérom v PBS; alebo (12) s roztokom PBS bez primárnej protilátky obsahujúcim 1 % normálneho konského séra.

Na rezy pre reakciu s roztokmi protilátok uvedenými pod bodmi 1,2 a 6 až 12 vyššie sa pôsobilo 20 minút pri RT 1,0 % Tritonom X-100, 0,4% hydrogénperoxidom v PBS, aby sa zablokovala endogénna peroxidáza. Potom sa inkubovali cez noc pri 4 °C s primárnou protilátkou. Rezy zreagované s 3D6 alebo 8E5 mAb sa potom nechali reagovať jednu hodinu pri RT s komplexom chrenová peroxidáza-avidín-biotín s komponentmi „A“ a „B“ súpravy zriedenými v pomere 1 : 75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Rezy zreagované s protilátkami špecifickými na CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 a roztok PBS bez primárnej protilátky sa inkubovali 1 hodinu pri RT s biotinylovaným anti-potkaním IgG (Vector) zriedeným v pomere 1 : 75 v PBS alebo s biotinylovaným anti-myším IgG (Vector) zriedeným v pomere 1 : 75 v PBS. Rezy sa potom nechali reagovať jednu hodinu pri RT s komplexom chrenová peroxidáza-avidín-biotín s komponentmi „A“ a „B“ súpravy zriedenými v pomere 1 : 75 v PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA).

Rezy sa vyvolali v 0,01 % hydroxide sodnom, 0,05 % 3,3'-diaminobenzidíne (DAB) pri RT. Na rezy určené na inkubáciu s protilátkami špecifickými na GFAP, MAC-1 a MHC II sa pôsobilo 0,6% hydrogénperoxidom pri RT, aby sa zablokovala endogénna peroxidáza, a potom sa inkubovali cez noc s primárnou protilátkou pri 4 °C. Rezy zreagované s GFAP protilátkou sa inkubovali 1 hodinu pri RT s biotinylovaným anti-myším IgG pripraveným v koňoch (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) zriedeným v pomere 1 : 200 s TBS. Rezy sa potom ďalej nechali reagovať jednu hodinu s komplexom avidín-biotín-peroxidáza (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) zriedeným v pomere 1:1000 s TBS. Rezy inkubované s monoklonálnou protilátkou špecifickou na MAC-1 alebo MHC II ako s primárnou protilátkou sa potom nechali reagovať 1 hodinu pri RT s biotinylovaným anti-potkaním IgG pripraveným v králikoch a zriedeným v pomere 1 : 200 s TBS, po čom nasledovala in-

kubácia 1 hodinu s komplexom avidín-biotín-peroxidáza zriedeným v pomere 1 : 100 s TBS. Rezy inkubované s protilátkami špecifickými na GFAP, MAC-1 a MHC II sa potom vyvolali pôsobením 0,05 % DAB, 0,01 % hydrogénperoxidu, 0,04 % chloridom nikelnatým v TBS 4, resp. 11 minút pri RT.

Imunoznačené rezy sa upevnili na mikroskopické sklíčka (VWR, Superfrost slides), nechali sa vysušiť cez noc na vzduchu, ponorili sa do Proparu (Anatech) a prekryli sa kryciami sklíčkami pomocou Permoutu (Fisher) ako upevňovacieho média.

Na zafarbenie A $\beta$  plakov sa časť GFAP-pozitívnych rezov upevnila na sklíčka Superfrost, ktoré sa inkubovali 7 minút v 1% vodnom roztoku tioflavínu S (Sigma), po čom nasledovalo imunohistochemické spracovanie. Rezy sa potom dehydrovali a očistili v Propare a potom sa prekryli kryciami sklíčkami upevnenými Permoutom.

### G. Analýza obrazov

Na analýzu imunoreaktívnych preparátov sa použil systém na analýzu obrazov Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) pripojený k mikroskopu Nikon Microphot-FX cez CCD videokameru a monitor Sony Trinitron. Obraz rezu sa uložil do vyrovnávacej pamäte videa a určil sa farebný a saturačný prah pre výber a výpočet celkovej plochy pixelov obsadených imunoznačkovými štruktúrami. Pre každý rez sa ručne ohraničil hipokampus a vypočítala sa celková plocha pixelov obsadených hipokampom. Percentuálny podiel množstva amyloidu sa meral ako: (podiel plochy hipokampu obsahujúci depozity A $\beta$  imunoreaktívne s mAb 3D6) x 100. Podobne sa meral percentuálny podiel neuritickej záťaže ako: (podiel plochy hipokampu obsahujúcej dystrofické neurity reaktívne s monoklonálnou protilátkou 8E5) x 100. C-Imaging systém (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) pracujúci s Simple 2 softvérovým aplikačným programom sa prepojil s mikroskopom Nikon Microphot-FX cez kameru Optonics a použil sa na kvantifikáciu percentuálneho podielu retrospeniálneho kortexu obsadeného GFAP-pozitívnymi astrocytmi a MAC-1- a MHC II-pozitívnou mikrogliou. Obraz imunoreaktívneho rezu sa uložil vo vyrovnávacej

pamäti videa a určil sa monochrómový prah pre výber a výpočet celkovej plochy pixelov obsadených imuno značkoványmi bunkami. Pre každý rez sa ručne ohraničil retrospleniálny kortex (RSC) a vypočítala sa celková plocha pixelov obsadených RSC. Percentuálny podiel astrocytózy sa definoval ako: (podiel RSC obsadeného GFAP-pozitívnymi astrocytmi) x 100. Podobne bol percentuálny podiel mikrogliózy definovaný ako: (podiel RSC obsadeného MAC-1- alebo MHC II-reaktívnou mikrogliou) x 100. Pri všetkých analýzach obrazov sa pre každé zviera kvantifikovalo šesť rezov na úrovni dorzálneho hipokampu získaných vo vzdialenostiach 240  $\mu\text{m}$  od seba. Vo všetkých prípadoch nebol vyhodnocujúcemu pracovníkovi známy spôsob liečby zvierat.

Aj keď bol uvedený vynález podrobne opísaný z dôvodov jasného porozumenia, bude zrejmé, že sa v rámci pripojených patentových nárokov môžu urobiť určité modifikácie. Všetky tu citované publikácie a patentové dokumenty, ako aj texty objavujúce sa v obrázkoch a zoznamoch sekvencií, sú tu teda zaradené ako odkazy vo svojej celosti na všetky účely v rovnakom rozsahu, ako by bol takto každý jednotlivito označený.

Z uvedeného bude zrejmé, že vynález ustanovuje rad využití. Vynález napríklad ustanovuje použitie ktorejkoľvek z vyššie opísaných protilátok k A $\beta$  pri liečbe, profylaxii alebo pri diagnostike amyloidogénnej choroby, alebo pri výrobe medikamentu alebo diagnostickej kompozície na to isté použitie.

## Zoznam sekvencií

&lt;110&gt; Neuralab Limited

&lt;120&gt; Humanizované protilátky, ktoré spoznajú beta-amyloidový peptid

&lt;130&gt; ELN-002PC

&lt;150&gt; 60/251,892

&lt;151&gt; 2000-12-06

&lt;160&gt; 63

&lt;170&gt; FastSEQ pre Windows verzia 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) ... (396)

&lt;221&gt; sig\_peptid

&lt;222&gt; (1) ... (60)

&lt;400&gt; 1

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg | 48  |
| Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg |     |
| -15 -10 -5                                                      |     |
| gaa acc aac ggt tat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg | 96  |
| Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser |     |
| 1 5 10                                                          |     |
| gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc | 144 |
| Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser |     |
| 15 20 25                                                        |     |
| ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg | 192 |
| Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg |     |
| 30 35 40                                                        |     |
| cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac | 240 |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp |     |
| 45 50 55 60                                                     |     |
| tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt | 288 |
| Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe |     |
| 65 70 75                                                        |     |
| aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat | 336 |
| Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr |     |



128  
2

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 80                                                              | 85  | 90  |     |
| tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag |     |     | 384 |
| Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys |     |     |     |
| 95                                                              | 100 | 105 |     |
| ctg gaa atc aaa                                                 |     |     | 396 |
| Leu Glu Ile Lys                                                 |     |     |     |
| 110                                                             |     |     |     |

<210> 2  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> SIGNÁL  
<222> (1) ... (20)

<400> 2

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

<210> 3  
<211> 414  
<212> DNA  
<213> Mus Musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) ... (414)

<221> sig\_peptid  
<222> (1) ... (57)

<400> 3

|                                                                 |  |  |    |
|-----------------------------------------------------------------|--|--|----|
| atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt |  |  | 48 |
| Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly |  |  |    |

129  
3

|                                                                 | -15 | -10 | -5  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| gtc cag tgt gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag |     |     |     | 96  |
| Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys |     |     |     |     |
|                                                                 | 1   | 5   | 10  |     |
| cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc |     |     |     | 144 |
| Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe |     |     |     |     |
|                                                                 | 15  | 20  | 25  |     |
| agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg |     |     |     | 192 |
| Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu |     |     |     |     |
|                                                                 | 30  | 35  | 40  | 45  |
| gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca |     |     |     | 240 |
| Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser |     |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |     |
| gac aat gta aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gag aat gcc aag aac |     |     |     | 288 |
| Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn |     |     |     |     |
|                                                                 | 65  | 70  | 75  |     |
| acc ctg tac ctg caa atg agt agt ctg aag tct gag gac acg gcc ttg |     |     |     | 336 |
| Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu |     |     |     |     |
|                                                                 | 80  | 85  | 90  |     |
| tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg |     |     |     | 384 |
| Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp |     |     |     |     |
|                                                                 | 95  | 100 | 105 |     |
| ggc cag ggc acc act gtc aca gtc tcc tca                         |     |     |     | 414 |
| Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser                         |     |     |     |     |
|                                                                 | 110 | 115 |     |     |

<210> 4

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SIGNÁL

<222> (1) ... (19)

<400> 4

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

130  
4

95 100 105  
Gly Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser  
110 115

<210> 5  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<221> SIGNÁL  
<222> (1) ... (20)

<223> humanizovaná 3D6 variabilná oblasť ľahkého reťazca

<400> 5  
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg  
-20 -15 -10 -5  
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
1 5 10  
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
15 20 25  
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys  
30 35 40  
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp  
45 50 55 60  
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
65 70 75  
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
80 85 90  
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
95 100 105  
Val Glu Ile Lys  
110

<210> 6  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> SIGNÁL  
<222> (1) ... (19)

<400> 6  
Met Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val  
-15 -10 -5  
Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala  
1 5 10  
Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr  
15 20 25  
Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu  
30 35 40 45  
Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val



<210> 9  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

<400> 9  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 10  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

<400> 10  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 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 Lys

<210> 11  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <221> SIGNÁL  
 <222> (1) ...(20)

<223> humanizovaná 3D6 variabilná oblasť ľahkého reťazca

&lt;400&gt; 11

```

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

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humanizovaná 3D6 variabilná oblasť ľahkého reťazca

&lt;221&gt; SIGNÁL

&lt;222&gt; (1) ... (19)

&lt;400&gt; 12

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
          -15          -10          -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          1          5          10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          15          20          25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30          35          40          45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
          50          55          60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          65          70          75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          80          85          90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
          95          100          105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110          115

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

134  
8

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) ... (393)

<221> sig\_peptid  
<222> (1) ... (57)

<400> 13

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct | 48  |
| Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala |     |
| -15 -10 -5                                                      |     |
| tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc | 96  |
| Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val |     |
| 1 5 10                                                          |     |
| agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att | 144 |
| Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile |     |
| 15 20 25                                                        |     |
| ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca | 192 |
| Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro |     |
| 30 35 40 45                                                     |     |
| ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct | 240 |
| Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca | 288 |
| Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr |     |
| 65 70 75                                                        |     |
| ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc | 336 |
| Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys |     |
| 80 85 90                                                        |     |
| ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg | 384 |
| Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu |     |
| 95 100 105                                                      |     |
| gag ctg gaa                                                     | 393 |
| Glu Leu Glu                                                     |     |
| 110                                                             |     |

<210> 14  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> SIGNAL  
<222> (1) ... (19)

<400> 14

|                                                                 |  |
|-----------------------------------------------------------------|--|
| Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala |  |
| -15 -10 -5                                                      |  |
| Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val |  |

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

<210> 15

<211> 426

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...(426)

<221> sig\_peptid

<222> (1) ... (57)

<400> 15

|                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat | 48          |
| Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr |             |
|                                                                 | -15 -10 -5  |
| gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag | 96          |
| Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln |             |
|                                                                 | 1 5 10      |
| tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg | 144         |
| Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu |             |
|                                                                 | 15 20 25    |
| agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag | 192         |
| Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys |             |
|                                                                 | 30 35 40 45 |
| ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat | 240         |
| Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr |             |
|                                                                 | 50 55 60    |
| aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga | 288         |
| Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg |             |
|                                                                 | 65 70 75    |
| aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc | 336         |
| Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala |             |
|                                                                 | 80 85 90    |
| aca tac tac tgt gtt cga agg ccc att act ccg gta cta gtc gat gct | 384         |



136  
10

Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala  
95 100 105

atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 426  
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120

<210> 16  
<211> 142  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> SIGNÁL  
<222> (1) ... (19)

<400> 16  
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr  
-15 -10 -5  
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln  
1 5 10  
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu  
15 20 25  
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys  
30 35 40 45  
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr  
50 55 60  
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg  
65 70 75  
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala  
80 85 90  
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala  
95 100 105  
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120

<210> 17  
<211> 136  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 17  
tccgcaagct tgccgccacc atggacatgc gcggtgccgc ccagctgctg ggctgtgctga 60  
tgctgtgggt gtccggctcc tccggtacg tgggtgatgac ccagtcctcc ctgtccctgc 120  
ccgtgacccc cggcga 136

<210> 18  
<211> 131  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>

137  
11

<223> Primér

<400> 18

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ctgggggggac | tggccgggct | tctgcagcag | ccagttcagg | taggtcttgc | cgtcggagtc | 60  |
| cagcaggggac | tgggaggact | tgcaggagat | ggaggcgggc | tcgccggggg | tcacgggcag | 120 |
| ggacagggggg | g          |            |            |            |            | 131 |

<210> 19

<211> 146

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Primér

<400> 19

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| acctgaactg | gctgctgcag | aagcccggcc | agtcccccca | gcgcctgata | tacctggtgt | 60  |
| ccaagctgga | ctccggcgtg | cccgaaccgt | tctccggctc | cggctccggc | accgacttca | 120 |
| ccctgaagat | ctcccgcgtg | gaggcc     |            |            |            | 146 |

<210> 20

<211> 142

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Primér

<400> 20

|            |             |            |            |            |            |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| aattctagga | tccaactcacg | cttgatctcc | accttggtgc | cctggccgaa | ggtgcggggg | 60  |
| aagtgggtgc | cctgccagca  | gtagtacacg | cccacgtcct | cggcctccac | gcgggagatc | 120 |
| ttcaggtga  | agtcggtgcc  | gg         |            |            |            | 142 |

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Primér

<400> 21

|             |        |    |
|-------------|--------|----|
| ctgggggggac | tggccg | 16 |
|-------------|--------|----|

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Primér

<400> 22  
acctgaactg gctgctgcag aa 22

<210> 23  
<211> 138  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 23  
acagaaagct tgccgccacc atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt 60  
taaaagggtg ccagtgtgag gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg 120  
gcggctccct gcgcctgt 138

<210> 24  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 24  
gccgccggag cggatggagg ccacccactc caggcccttg ccgggggcct ggcgcaccca 60  
ggacatgccg tagttggaga aggtgaagcc ggaggcggcg caggacaggc gcaggagacc 120  
gccgggctgc accag 135

<210> 25  
<211> 142  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 25  
ctggagtggg tggcctccat ccgctccggc ggccggccgca cctactactc cgacaacgtg 60  
aagggccgct tcaccatctc ccgcgacaac gccagaact ccctgtacct gcagatgaac 120  
tccttgccgc ccgaggacac cg 142

<210> 26  
<211> 144  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 26  
ctgcaaggat cactcaccg gaggacacgg tcaccagggt gccctggccc cagtagtcgg 60

aggagccgga gtagtggtcg tagcgcacgc agtagtacag ggcggtgtcc tcggcgcgca 120  
gggagttcat ctgcaggtac aggg 144

<210> 27  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 27  
gccgccggag cggatg 16

<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 28  
ctggagtggg tggcctccat 20

<210> 29  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 29  
tccgcaagct tgccgccac 19

<210> 30  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Primér

<400> 30  
aattctagga tccactcacg cttgatctc 29

<210> 31  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

740  
14

<220>

<223> Primér

<400> 31

acagaaagct tgccgccacc atg

23

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Primér

<400> 32

ctgcaaggat ccactcaccg ga

22

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Interný peptid

<400> 33

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr  
1 5 10

<210> 34

<211> 402

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> h3D6 verzia 1 VL

<400> 34

|            |             |            |            |            |            |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggacatgc | gcgtgcccgc  | ccagctgctg | ggcctgctga | tgctgtgggt | gtccggetcc | 60  |
| tccggctacg | tggatgatgac | ccagtccccc | ctgtccctgc | ccgtgacccc | cggcgagccc | 120 |
| gcctccatct | cctgcaagtc  | ctcccagtec | ctgctggact | ccgacggcaa | gacctacctg | 180 |
| aactggctgc | tgcagaagcc  | cggccagtec | ccccagcgcc | tgatctacct | ggtgtccaag | 240 |
| ctggactccg | gcgtgcccga  | ccgcttctcc | ggctccggct | ccggcaccga | cttcaccctg | 300 |
| aagatctccc | gcgtggaggc  | cgaggacgtg | ggcgtgtact | actgctggca | gggcacccac | 360 |
| ttcccccgca | ccttcggcca  | gggcaccaag | gtggagatca | ag         |            | 402 |

<210> 35

<211> 402

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> h3D6 verzia 2 VL

<400> 35

|            |             |            |             |            |            |     |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| atggacatgc | gcgtgcccgc  | ccagctgctg | ggcctgctga  | tgctgtgggt | gtccggetcc | 60  |
| tccggcgacg | tggtgatgac  | ccagtcctcc | ctgtccctgc  | ccgtgacccc | cggcgagccc | 120 |
| gcctccatct | cctgcaagtc  | ctcccagtc  | ctgtgtggact | ccgacggcaa | gacctacctg | 180 |
| aactggctgc | tgacagaagcc | cggccagtc  | ccccagcgcc  | tgatctacct | ggtgtccaag | 240 |
| ctggactccg | gcgtgcccga  | ccgcttctcc | ggctccggct  | ccggcaccga | cttcaccctg | 300 |
| aagatctccc | gcgtggaggc  | cgaggacgtg | ggcgtgtact  | actgctggca | gggcacccac | 360 |
| ttcccccgca | ccttcggcca  | gggcaccaag | gtggagatca  | ag         |            | 402 |

<210> 36

<211> 414

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> h3D6 verzia 1 VH

<400> 36

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggagtttg | ggctgagctg | gctttttctt | gtggctatct | taaaagggtg | ccagtgtgag | 60  |
| gtgcagctgc | tgagtcggg  | cggcgccctg | gtgcagcccg | gcggctccct | gcgcctgtcc | 120 |
| tgccgcgcct | ccggcttcac | cttctccaac | tacggcatgt | cctgggtgcg | ccaggccccc | 180 |
| ggcaagggcc | tgagtggtg  | ggcctccatc | cgctccggcg | gcggccgcac | ctactactcc | 240 |
| gacaacgtga | agggccgctt | caccatctcc | cgcgacaacg | ccaagaactc | cctgtacctg | 300 |
| cagatgaact | ccctgcgcgc | cgaggacacc | gccctgtact | actgcgtgcg | ctacgaccac | 360 |
| tactccggct | cctccgacta | ctggggccag | ggcaccctgg | tgaccgtgtc | ctcc       | 414 |

<210> 37

<211> 414

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> h3D6 verzia 2 VH

<400> 37

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggagtttg | ggctgagctg | gctttttctt | gtggctatct | taaaagggtg | ccagtgtgag | 60  |
| gtgcagctgc | tgagtcggg  | cggcgccctg | gtgcagcccg | gcggctccct | gcgcctgtcc | 120 |
| tgccgcgcct | ccggcttcac | cttctccaac | tacggcatgt | cctgggtgcg | ccaggccccc | 180 |
| ggcaagggcc | tgagtggtg  | ggcctccatc | cgctccggcg | gcggccgcac | ctactactcc | 240 |
| gacaacgtga | agggccgctt | caccatctcc | cgcgacaact | ccaagaacac | cctgtacctg | 300 |
| cagatgaact | ccctgcgcgc | cgaggacacc | gccgtgtact | actgcgtgcg | ctacgaccac | 360 |
| tactccggct | cctccgacta | ctggggccag | ggcaccctgg | tgaccgtgtc |            |     |

<210> 38

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 38

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg



143  
17

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Val | Arg | Ala | Glu | Gln | Lys | Asp | Arg | Gln | His | Thr | Leu | Lys | His | Phe |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Glu | His | Val | Arg | Met | Val | Asp | Pro | Lys | Lys | Ala | Ala | Gln | Ile | Arg | Ser |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Gln | Val | Met | Thr | His | Leu | Arg | Val | Ile | Tyr | Glu | Arg | Met | Asn | Gln | Ser |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Leu | Leu | Tyr | Asn | Val | Pro | Ala | Val | Ala | Glu | Glu | Ile | Gln | Asp |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Glu | Val | Asp | Glu | Leu | Gln | Lys | Glu | Gln | Asn | Tyr | Ser | Asp | Asp | Val |     |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |
| Leu | Ala | Asn | Met | Ile | Ser | Glu | Pro | Arg | Ile | Ser | Tyr | Gly | Asn | Asp | Ala |
|     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Met | Pro | Ser | Leu | Thr | Glu | Thr | Lys | Thr | Thr | Val | Glu | Leu | Leu | Pro |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Val | Asn | Gly | Glu | Phe | Ser | Leu | Asp | Asp | Leu | Gln | Pro | Trp | His | Ser | Phe |
|     | 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Asp | Ser | Val | Pro | Ala | Asn | Thr | Glu | Asn | Glu | Val | Glu | Pro | Val |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Asp | Ala | Arg | Pro | Ala | Ala | Asp | Arg | Gly | Leu | Thr | Thr | Arg | Pro | Gly | Ser |
|     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |     |
| Gly | Leu | Thr | Asn | Ile | Lys | Thr | Glu | Glu | Ile | Ser | Glu | Val | Lys | Met | Asp |
|     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln | Lys | Leu |
|     | 675 |     |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Val | Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Leu | Met | Val | Gly | Gly | Val | Val | Ile | Ala | Thr | Val | Ile | Val | Ile | Thr | Leu |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     | 715 |     |     |     |     |     | 720 |
| Val | Met | Leu | Lys | Lys | Lys | Gln | Tyr | Thr | Ser | Ile | His | His | Gly | Val | Val |
|     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |     |
| Glu | Val | Asp | Ala | Ala | Val | Thr | Pro | Glu | Glu | Arg | His | Leu | Ser | Lys | Met |
|     |     | 740 |     |     |     |     |     | 745 |     |     |     | 750 |     |     |     |
| Gln | Gln | Asn | Gly | Tyr | Glu | Asn | Pro | Thr | Tyr | Lys | Phe | Phe | Glu | Gln | Met |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Gln | Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     | 770 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 39

<211> 15

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 39

acttatatct gtttt

15

<210> 40

<211> 15

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 40



acttatacac ttgt 15

<210> 41  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 41  
acttatgttc attst 15

<210> 42  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 42  
acttatgccc attggt 16

<210> 43  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 43  
acttatatat attgt 15

<210> 44  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 44  
acttatgkyy attg 14

<210> 45  
<211> 15  
<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 45

acttatgtat acayw

15

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 46

acttatggct ymtct

15

<210> 47

<211> 13

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 47

acttattccc att

13

<210> 48

<211> 14

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 48

acttatatgt tctc

14

<210> 49

<211> 14

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 49

acttataccc attt

14

<210> 50

<211> 11

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 50

ggacggttgg g

11

<210> 51

<211> 14

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 51

acttataggg tttt

14

<210> 52

<211> 14

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 52

acttatgggr tttt

14

<210> 53

<211> 14

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 53

147  
21

acttatatgt agtt

14

<210> 54  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 54  
acttatatgt gtt

13

<210> 55  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 55  
acttatacgt atttt

15

<210> 56  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 56  
acttatctts ttg

14

<210> 57  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 57  
acttatrggg tttt

14

<210> 58  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 58  
acttatgttt ttg

13

<210> 59  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 59  
acttatmgtg mtttt

15

<210> 60  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 60  
acttatggtc tctt

14

<210> 61  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> <213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Priméry

<400> 61  
acttatatgt tttt

14

<210> 62  
<211> 14  
<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 62

acttattttg ttat

14

<210> 63

<211> 11

<212> DNA

<213> <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Priméry

<400> 63

ggacgggaca g

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:2, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ľahkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny obsahujúcej:
  - (a) zvyšok, ktorý sa nekovalentne viaže priamo na antigén;
  - (b) zvyšok susediaci s CDR;
  - (c) CDR-interagujúci zvyšok; a
  - (d) zvyšok nachádzajúci sa na rozhraní VL-VH.
  
2. Ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:4, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny obsahujúcej:
  - (a) zvyšok, ktorý sa nekovalentne viaže priamo na antigén;
  - (b) zvyšok susediaci s CDR;
  - (c) CDR-interagujúci zvyšok ; a
  - (d) zvyšok nachádzajúci sa na rozhraní VL-VH.

3. Ľahký reťazec podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 3D6 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1CR9.
4. Ľahký reťazec podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 3D6 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1NLD.
5. Ťažký reťazec podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 3D6 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1OPG.
6. Ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:2, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ľahkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je schopný ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ľahkého reťazca, ako sa určilo analýzou trojrozmerného modelu 3D6 variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu.
7. Ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:4, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť z ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rám-



covej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je schopný ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ťažkého reťazca, ako sa určilo analýzou trojrozmerného modelu 3D6 variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu.

8. Ľahký reťazec podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie zo skupiny obsahujúcej zvyšok schopný interakcie s antigénom, zvyšok v blízkosti väzbového miesta antigénu, zvyšok spôsobilý interakcie s CDR, zvyšok susediaci s CDR, zvyšok do vzdialenosti 6 Å od CDR zvyšku, kánonický zvyšok, zvyšok vernierovej zóny, medzireťazcový zvyšok, zriedkavý zvyšok alebo zvyšok glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.
9. Ťažký reťazec podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie zo skupiny obsahujúcej zvyšok schopný interakcie s antigénom, zvyšok v blízkosti väzbového miesta antigénu, zvyšok spôsobilý interakcie s CDR, zvyšok susediaci s CDR, zvyšok do vzdialenosti 6 Å od CDR zvyšku, kánonický zvyšok, zvyšok vernierovej zóny, medzireťazcový zvyšok, neobvyklý zvyšok alebo zvyšok glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.
10. Ľahký reťazec podľa nároku 6 alebo 8, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 3D6 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1CR9.

11. Ľahký reťazec podľa nároku 6 alebo 8, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 3D6 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1NLD.
12. Ťažký reťazec podľa nároku 7 alebo 9, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 3D6 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre 1OPG.
13. Ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:2, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť z ľahkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti vybratý zo skupiny obsahujúcej L1, L2, L36 a L46 (Kabatovo číslovanie) je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca.
14. Ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:4, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť z ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti vybratý zo skupiny obsahujúcej H49, H93 a H94 (Kabatovo číslovanie) je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 3D6 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca.
15. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11 a 13, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akceptorný ľahký reťazec je podtypu kapa II (Kabatova konvencia).

16. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 2, 5, 7, 9, 12 a 14, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akceptorný ťažký reťazec je podtypu III (Kabato-va konvencia).
17. Ľahký reťazec podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akcep-torný ľahký reťazec je vybratý zo skupiny obsahujúcej Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 a Kabat ID U41645.
18. Ľahký reťazec podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akcep-torný ľahký reťazec je Kabat ID 019230.
19. Ťažký reťazec podľa nároku 16, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akcep-torný ťažký reťazec je vybratý zo skupiny obsahujúcej Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 a Kabat ID M23691.
20. Ťažký reťazec podľa nároku 16, **vyznačujúci sa tým**, že ľudský akcep-torný ťažký reťazec je Kabat ID 045919.
21. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 a 18, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rám-covej oblasti je substituovaný aminokyselinovým zvyškom, ktorý je bež-ný pre ľudské variabilné sekvencie ľahkého reťazca v tejto polohe.
22. Ľahký reťazec podľa nároku 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 a 18, **vyzna-čujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti

je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom so zárodočnej variabilnej sekvencie ľahkého reťazca.

23. Ľahký reťazec podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ľahkého reťazca sa vyberie zo skupiny obsahujúcej A1, A17, A18, A2 a A19.
24. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 a 20, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný aminokyselinovým zvyškom, ktorý je bežný pre ľudské variabilné sekvencie ťažkého reťazca v tejto polohe.
25. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 a 20, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom so zárodočnej variabilnej sekvencie ťažkého reťazca.
26. Ťažký reťazec podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ťažkého reťazca sa vyberie zo skupiny obsahujúcej VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 a VH3-11.
27. Ťažký reťazec podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ťažkého reťazca je VH3-23.
28. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 21 až 23, **vyznačujúci sa tým**, že zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe v menej než 10 % ľudských sekvencií variabilnej oblasti

ľahkého reťazca v podskupine variabilných oblastí ľahkého reťazca, a bežný zvyšok sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe vo viac než 50 % sekvencií v podskupine variabilných oblastí ľahkého reťazca.

29. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 24 až 26, **vyznačujúci sa tým**, že zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe v menej než 10 % ľudských sekvencií variabilnej oblasti ťažkého reťazca v podskupine variabilných oblastí ťažkého reťazca, a bežný zvyšok sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe vo viac než 50 % sekvencií v podskupine variabilných oblastí ťažkého reťazca.
30. Ľahký reťazec obsahujúci komplementaritu určujúce oblasti (CDR) a zvyšky variabilnej rámcovej oblasti L1, L2, L36 a L46 (Kabatovo číslovanie) z 3D6 ľahkého reťazca monoklonálnej protilátky, pričom zostávajúca časť ľahkého reťazca je z ľudského imunoglobulínu.
31. Ťažký reťazec obsahujúci komplementaritu určujúce oblasti (CDR) a zvyšky variabilnej rámcovej oblasti H49, H93 a H94 (Kabatovo číslovanie) z 3D6 ťažkého reťazca monoklonálnej protilátky, pričom zostávajúca časť ťažkého reťazca je z ľudského imunoglobulínu.
32. Humanizovaný imunoglobulín obsahujúci ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 a 18 a ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 a 20 alebo fragment viažuci antigén uvedeného imunoglobulínu.

33. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$ .
34. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^8 M^{-1}$ .
35. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^9 M^{-1}$ .
36. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že izotyp ťažkého reťazca je  $\gamma 1$ .
37. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že sa viaže na rozpustný beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) aj na agregovaný  $A\beta$ .
38. Imunoglobulín podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že rozpustný beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) je disagregovaný  $A\beta$ .
39. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že sprostredkuje fagocytózu beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ).

40. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že prechádza v pacientovi cez hematoencefalitickú bariéru.
41. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje u pacienta množstvo beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ) a neuritickú dystrofiu.
42. Humanizovaný imunoglobulín obsahujúci humanizovaný ťažký reťazec a humanizovaný ľahký reťazec, pričom
- (a) humanizovaný ľahký reťazec zahŕňa tri komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3), ktoré majú sekvencie aminokyselín z zodpovedajúcich komplementaritu určujúcich oblastí myšej 3D6 variabilnej domény ľahkého reťazca imunoglobulínu označenej ako SEQ ID NO:2, a variabilnú rámcovú oblasť z ľudskej sekvencie variabilnej rámcovej oblasti ľahkého reťazca za predpokladu, že aspoň jedna poloha vybratá z prvej skupiny obsahujúcej L1, L2, L36 a L46 (Kabatovo číslovanie) je obsadená rovnakým aminokyselinovým zvyškom, aký je prítomný v ekvivalentnej polohe myšej 3D6 variabilnej rámcovej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu; a
- (b) humanizovaný ťažký reťazec zahŕňa tri komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3), ktoré majú sekvencie aminokyselín z zodpovedajúcich komplementaritu určujúcich oblastí myšej 3D6 variabilnej domény ťažkého reťazca imunoglobulínu označenej ako SEQ ID NO:4, a variabilnú rámcovú oblasť z ľudskej sekvencie variabilnej rámcovej oblasti ťažkého reťazca za predpokladu, že aspoň jedna poloha vybratá z druhej skupiny obsahujúcej H49, H93 a H94 (Kabatovo číslovanie) je obsadená rovnakým aminokyselinovým zvyškom, aký je prítomný v ekvivalentnej polohe myšej 3D6 variabilnej rámcovej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu;

pričom humanizovaný imunoglobulín sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$  a v ktorom 3D6 imunoglobulín má ľahký reťazec s variabilnou doménou označenou ako SEQ ID NO:2 a ťažký reťazec s variabilnou doménou označenou ako SEQ ID NO:4.

43. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ľahkého reťazca je z kapa variabilnej oblasti ľahkého reťazca.
44. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ťažkého reťazca je z IgG1 variabilnej oblasti ťažkého reťazca.
45. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ľahkého reťazca je z ľahkého reťazca vybratého zo skupiny obsahujúcej Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 a Kabat ID U41645.
46. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ťažkého reťazca je z ťažkého reťazca vybratého zo skupiny obsahujúcej Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 a Kabat ID M23691.
47. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že humanizovaná variabilná rámcová oblasť ľahkého reťazca je identická so sekvenciou variabilnej rámcovej oblasti ľahkého reťazca Kabat ID



019230, s výnimkou polôh z prvej skupiny, a variabilná rámcová oblasť ťažkého reťazca je identická so sekvenciou variabilnej rámcovej oblasti ťažkého reťazca Kabat ID 045919, s výnimkou polôh z druhej skupiny.

48. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 42, **vyznačujúci sa tým**, že humanizovaný ľahký reťazec obsahuje komplementaritu určujúce oblasti, ktoré sú identické s zodpovedajúcimi komplementaritu určujúcimi oblasťami myšieho 3D6 ľahkého reťazca, a humanizovaný ťažký reťazec obsahuje komplementaritu určujúce oblasti, ktoré sú identické s zodpovedajúcimi komplementaritu určujúcimi oblasťami myšieho 3D6 ťažkého reťazca.
49. Humanizovaná protilátka obsahujúca komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3) 3D6 variabilnej sekvencie ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:2.
50. Humanizovaná protilátka obsahujúca komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3) 3D6 variabilnej sekvencie ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:4.
51. Humanizovaná protilátka alebo jej fragment viažuci antigén, ktorá sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ), obsahujúca variabilnú oblasť obsahujúcu komplementaritu určujúce oblasti (CDR) zodpovedajúce CDR z myšej 3D6 protilátky.
52. Humanizovaná protilátka, ktorá sa viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s afinitou aspoň  $10^7 \text{ M}^{-1}$  obsahujúca:

- (a) variabilnú doménu ľahkého reťazca obsahujúcu aminokyselinové zvyšky myšej 3D6 komplementaritu určujúcej oblasti (CDR) a aminokyselinové zvyšky ľudskej rámcovej oblasti variabilnej domény VL podskupiny II; a
- (b) variabilnú doménu ťažkého reťazca obsahujúcu aminokyselinové zvyšky myšej 3D6 komplementaritu určujúcej oblasti (CDR) a aminokyselinové zvyšky ľudskej rámcovej oblasti variabilnej domény VH podskupiny III.
53. Chimérický imunoglobulín obsahujúci komplementaritu určujúce oblasti (CDR) variabilnej oblasti zo sekvencií 3D6 variabilnej oblasti imunoglobulínu uvedených ako SEQ ID NO:2 alebo SEQ ID NO:4 a variabilné rámcové oblasti z ľudského akceptorného imunoglobulínu.
54. Imunoglobulín alebo jeho fragment viažuci antigén obsahujúci variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:8, a variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:5.
55. Imunoglobulín alebo jeho fragment viažuci antigén obsahujúci variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:12, a variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:11.
56. Imunoglobulín obsahujúci variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:8, variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:5, a konštantné oblasti z IgG1.

57. Imunoglobulín obsahujúci variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:12, variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je uvedená v SEQ ID NO:11, a konštantné oblasti z IgG1.
58. Spôsob prevencie alebo liečby amyloidogénneho ochorenia u pacienta zahŕňajúci podanie účinnej dávky humanizovaného imunoglobulínu podľa niektorého z nárokov 32 až 52 pacientovi.
59. Spôsob prevencie alebo liečby Alzheimerovej choroby u pacienta zahŕňajúci podanie účinnej dávky humanizovaného imunoglobulínu podľa niektorého z nárokov 32 až 52 pacientovi.
60. Spôsob podľa nároku 59, **vyznačujúci sa tým**, že účinná dávka humanizovaného imunoglobulínu je 1 mg/kg telesnej hmotnosti.
61. Spôsob podľa nároku 59, **vyznačujúci sa tým**, že účinná dávka humanizovaného imunoglobulínu je 10 mg/kg telesnej hmotnosti.
62. Farmaceutická kompozícia obsahujúca imunoglobulín podľa niektorého z nárokov 32 až 52 a farmaceutický nosič.
63. Izolovaný polypeptid obsahujúci fragment SEQ ID NO:2 vybraný zo skupiny obsahujúcej aminokyseliny 24-39 SEQ ID NO:2, aminokyseliny 55-61 SEQ ID NO:2 a aminokyseliny 94-102 SEQ ID NO:2.

64. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyseliny 24-39 SEQ ID NO:2, aminokyseliny 55-61 SEQ ID NO:2 a aminokyseliny 94-102 SEQ ID NO:2.
65. Izolovaný polypeptid obsahujúci fragment SEQ ID NO:4 vybraný zo skupiny obsahujúcej aminokyseliny 31-35 SEQ ID NO:4, aminokyseliny 50-66 SEQ ID NO:4 a aminokyseliny 99-107 SEQ ID NO:4.
66. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyseliny 31-35 SEQ ID NO:4, aminokyseliny 50-66 SEQ ID NO:4 a aminokyseliny 99-107 SEQ ID NO:4.
67. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:2.
68. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:4.
69. Variant polypeptidu obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:2, pričom uvedený variant obsahuje aspoň jednu konzervatívnu aminokyselinovú substitúciu a zachová si schopnosť priamej špecifickej väzby na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$ .
70. Variant polypeptidu obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:4, pričom uvedený variant obsahuje aspoň jednu konzervatívnu aminokyselinovú substitúciu a zachová si schopnosť priamej špecifickej väzby na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$ .

71. Izolovaný polypeptid obsahujúci zvyšky 1 až 112 sekvencie aminokyselín SEQ ID NO:2 alebo zvyšky 1 až 119 sekvencie aminokyselín SEQ ID NO:4.
72. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 a 18.
73. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 a 20.
74. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca polypeptid podľa niektorého z nárokov 64 až 71.
75. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca imunoglobulín podľa niektorého z nárokov 32 až 57.
76. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny obsahujúca sekvenciu nukleotidov SEQ ID NO:1 alebo 3.
77. Vektor obsahujúci molekulu nukleovej kyseliny podľa niektorého z nárokov 72 až 76.
78. Hostiteľská bunka obsahujúca molekulu nukleovej kyseliny podľa niektorého z nárokov 72 až 76.

79. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu zahŕňajúci kultivovanie hostiteľskej bunky podľa nároku 45 za takých podmienok, že sa vyrobí táto protilátka alebo fragment, a izolovanie uvedenej protilátky z hostiteľskej bunky alebo kultúry.
80. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu, pričom uvedený spôsob zahŕňa kultivovanie hostiteľskej bunky, ktorá exprimuje molekulu nukleovej kyseliny kódujúcu uvedenú protilátku alebo fragment za takých podmienok, že sa vyrába táto protilátka alebo fragment, a izolovanie uvedenej protilátky alebo fragmentu z hostiteľskej bunky alebo kultúry, pričom uvedená protilátka alebo fragment obsahujú aminokyseliny 24-39 SEQ ID NO:2, aminokyseliny 55-61 SEQ ID NO:2 a aminokyseliny 94-102 SEQ ID NO:2.
81. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu, pričom uvedený spôsob zahŕňa kultivovanie hostiteľskej bunky, ktorá exprimuje molekulu nukleovej kyseliny kódujúcu uvedenú protilátku alebo fragment za takých podmienok, že sa vyrába táto protilátka alebo fragment, a izolovanie uvedenej protilátky z hostiteľskej bunky alebo kultúry, pričom uvedená protilátka alebo fragment obsahujú aminokyseliny 31-35 SEQ ID NO:4, aminokyseliny 50-66 SEQ ID NO:4 a aminokyseliny 99-112 SEQ ID NO:4.
82. Spôsob identifikácie zvyškov vhodných na substitúciu vo variabilnej rámcovej oblasti humanizovaného 3D6 imunoglobulínu, zahŕňajúci modelovanie trojrozmernej štruktúry 3D6 variabilnej oblasti založené na vyriešenej štruktúre imunoglobulínu, a analyzovanie uvedeného modelu na zvyšky schopné ovplyvňovať konformáciu a funkciu variabilnej oblasti 3D6 imunoglobulínu tak, že sa identifikujú zvyšky vhodné na substitúciu.

83. Použitie sekvencie variabilnej oblasti uvedenej ako SEQ ID NO:2 alebo SEQ ID NO:4 alebo nejakej ich inej časti pri príprave trojrozmerného obrazu 3D6 imunoglobulínu, 3D6 imunoglobulínového reťazca alebo jeho domény.
84. Ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:14, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ľahkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny obsahujúcej:
- (a) zvyšok, ktorý sa nekovalentne viaže priamo na antigén;
  - (b) zvyšok susediaci s CDR;
  - (c) CDR-interagujúci zvyšok; a
  - (d) zvyšok nachádzajúci sa na rozhraní VL-VH.
85. Ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:16, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je vybratý zo skupiny obsahujúcej:
- (a) zvyšok, ktorý sa nekovalentne viaže priamo na antigén;
  - (b) zvyšok susediaci s CDR;

- (c) CDR-interagujúci zvyšok ; a
- (d) zvyšok nachádzajúci sa na rozhraní VL-VH.

- 86. Ľahký reťazec podľa nároku 84, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.
- 87. Ľahký reťazec podľa nároku 84, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 80% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.
- 88. Ľahký reťazec podľa nároku 84, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 90% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.
- 89. Ťažký reťazec podľa nároku 85, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.
- 90. Ťažký reťazec podľa nároku 85, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 80% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.



91. Ťažký reťazec podľa nároku 85, **vyznačujúci sa tým**, že CDR-interagujúci zvyšok sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 90% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.
92. Ľahký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:14, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť zo sekvencie ľahkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ľahkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je schopný ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ľahkého reťazca, ako sa určilo analýzou trojrozmerného modelu 10D5 variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínu.
93. Ťažký reťazec humanizovaného imunoglobulínu obsahujúci (i) variabilnú oblasť komplementaritu určujúcich oblastí (CDR) z 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu uvedenej ako SEQ ID NO:16, a (ii) variabilnú rámcovú oblasť z ťažkého reťazca ľudského akceptorného imunoglobulínu za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom z myšej 10D5 sekvencie variabilnej oblasti ťažkého reťazca, pričom tento zvyšok rámcovej oblasti je schopný ovplyvňovať konformáciu alebo funkciu variabilnej oblasti ťažkého reťazca, ako sa určilo analýzou trojrozmerného modelu 10D5 variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu.

94. Ľahký reťazec podľa nároku 92, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie zo skupiny obsahujúcej zvyšok schopný interakcie s antigénom, zvyšok v blízkosti väzbového miesta antigénu, zvyšok spôsobilý interakcie s CDR, zvyšok susediaci s CDR, zvyšok do vzdialenosti 0,6 nm od CDR zvyšku, kánonický zvyšok, zvyšok vernierovej zóny, medzireťazcový zvyšok, zriedkavý zvyšok alebo zvyšok glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.
95. Ťažký reťazec podľa nároku 93, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie zo skupiny obsahujúcej zvyšok schopný interakcie s antigénom, zvyšok v blízkosti väzbového miesta antigénu, zvyšok spôsobilý interakcie s CDR, zvyšok susediaci s CDR, zvyšok do vzdialenosti 0,6 nm od CDR zvyšku, kánonický zvyšok, zvyšok vernierovej zóny, medzireťazcový zvyšok, neobvyklý zvyšok alebo zvyšok glykozylačného miesta na povrchu štruktúrneho modelu.
96. Ľahký reťazec podľa nároku 92 alebo 94, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.
97. Ľahký reťazec podľa nároku 92 alebo 94, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 80% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.
98. Ľahký reťazec podľa nároku 92 alebo 94, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ľahkého reťazca za-

loženom na vyriešenej štruktúre ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 90% identitu sekvencií s ľahkým reťazcom 10D5.

99. Ťažký reťazec podľa nároku 93 alebo 95, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.
100. Ťažký reťazec podľa nároku 93 alebo 95, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 80% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.
101. Ťažký reťazec podľa nároku 93 alebo 95, **vyznačujúci sa tým**, že zvyšok rámcovej oblasti sa identifikuje modelovaním 10D5 ťažkého reťazca založenom na vyriešenej štruktúre ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu, ktorý má aspoň 90% identitu sekvencií s ťažkým reťazcom 10D5.
102. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 84, 86 až 88, 92, 94 a 96 až 98, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný aminokyselinovým zvyškom, ktorý je bežný pre ľudské variabilné sekvencie ľahkého reťazca v tejto polohe.
103. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 84, 86 až 88, 92, 94 a 96 až 98, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom so zárodočnej variabilnej sekvencie ľahkého reťazca.

104. Ľahký reťazec podľa nároku 103, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ľahkého reťazca je rovnaká ako v imunoglobulíne alebo má aspoň 70% identitu s variabilnou sekvenciou ľahkého reťazca SEQ ID No:14.
105. Ľahký reťazec podľa nároku 103, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ľahkého reťazca je rovnaká ako v imunoglobulíne alebo má aspoň 80% identitu s variabilnou sekvenciou ľahkého reťazca SEQ ID No:14.
106. Ľahký reťazec podľa nároku 103, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ľahkého reťazca je rovnaká ako v imunoglobulíne alebo má aspoň 90% identitu s variabilnou sekvenciou ľahkého reťazca SEQ ID No:14.
107. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 85, 89 až 91, 93 a 99 až 101, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný aminokyselinovým zvyškom, ktorý je bežný pre ľudske variabilné sekvencie ťažkého reťazca v tejto polohe.
108. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 85, 89 až 91, 93 a 99 až 101, **vyznačujúci sa tým**, že aspoň jeden zriedkavý zvyšok ľudskej rámcovej oblasti je substituovaný zodpovedajúcim aminokyselinovým zvyškom zo zárodočnej sekvencie ťažkého reťazca.
109. Ťažký reťazec podľa nároku 108, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ťažkého reťazca je taká istá alebo majúca aspoň 70% identitu s variabilnou sekvenciou ťažkého reťazca SEQ ID NO:16.

110. Ťažký reťazec podľa nároku 108, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ťažkého reťazca je taká istá alebo majúca aspoň 80% identitu s variabilnou sekvenciou ťažkého reťazca sekvencie č. 16.
111. Ťažký reťazec podľa nároku 108, **vyznačujúci sa tým**, že zárodočná variabilná sekvencia ťažkého reťazca je taká istá alebo majúca aspoň 90% identitu s variabilnou sekvenciou ťažkého reťazca sekvencie č. 16.
112. Ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 102 až 106, **vyznačujúci sa tým**, že zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe v menej než 10 % ľudských sekvencií variabilnej oblasti ľahkého reťazca v podskupine variabilných oblastí ľahkého reťazca, a bežný zvyšok sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe vo viac než 50 % sekvencií v podskupine variabilných oblastí ľahkého reťazca.
113. Ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 107 až 111, **vyznačujúci sa tým**, že zriedkavý zvyšok rámcovej oblasti sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe v menej než 10 % ľudských sekvencií variabilnej oblasti ťažkého reťazca v podskupine variabilných oblastí ťažkého reťazca, a bežný zvyšok sa vyberie na základe jeho výskytu v tejto polohe vo viac než 50 % sekvencií v podskupine variabilných oblastí ťažkého reťazca.
114. Humanizovaný imunoglobulín obsahujúci ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 84, 86 až 88, 92, 94 a 96 až 98 a ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 85, 89 až 91, 93 a 99 až 101 alebo fragment viažuci antigén uvedeného imunoglobulínu.

115. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 M^{-1}$ .
116. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^8 M^{-1}$ .
117. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^9 M^{-1}$ .
118. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že izotyp ťažkého reťazca je  $\gamma 1$ .
119. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že sa viaže na agregovaný beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ).
120. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že sprostredkuje fagocytózu beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ).
121. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že prechádza v pacientovi cez hematoencefalitickú bariéru.

122. Imunoglobulín alebo fragment viažuci antigén podľa nároku 114, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje u pacienta množstvo plakov beta amyloidového peptidu ( $A\beta$ ).
123. Humanizovaný imunoglobulín obsahujúci humanizovaný ťažký reťazec a humanizovaný ľahký reťazec, v ktorom
- (a) humanizovaný ľahký reťazec zahŕňa tri komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3), ktoré majú sekvencie aminokyselín z zodpovedajúcich komplementaritu určujúcich oblastí myšej 10D5 variabilnej domény ľahkého reťazca imunoglobulínu označenej ako SEQ ID NO:14, a variabilnú rámcovú oblasť z ľudskej sekvencie variabilnej rámcovej oblasti ľahkého reťazca za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok z rámcovej oblasti vybraný zo skupiny obsahujúcej kánonický zvyšok, vernierov zvyšok, pakovací zvyšok a zriedkavý zvyšok, je obsadený rovnakým aminokyselinovým zvyškom, aký je prítomný v ekvivalentnej polohe 10D5 variabilnej rámcovej oblasti ľahkého reťazca myšieho imunoglobulínu; a
- (b) humanizovaný ťažký reťazec zahŕňa tri komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3), ktoré majú sekvencie aminokyselín z zodpovedajúcich komplementaritu určujúcich oblastí 10D5 variabilnej domény ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu označenej ako SEQ ID NO:16, a variabilnú rámcovú oblasť z ľudskej sekvencie variabilnej rámcovej oblasti ťažkého reťazca za predpokladu, že aspoň jeden zvyšok rámcovej oblasti vybraný z druhej skupiny obsahujúcej kánonický zvyšok, vernierov zvyšok, pakovací zvyšok a zriedkavý zvyšok, je obsadený rovnakým aminokyselinovým zvyškom, aký je prítomný v ekvivalentnej polohe 10D5 variabilnej rámcovej oblasti ťažkého reťazca myšieho imunoglobulínu;
- v ktorom humanizovaný imunoglobulín sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid („ $A\beta$ “) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 \text{ M}^{-1}$  a v ktorom 10D5 imunoglobulín má ľahký reťazec s variabilnou doménou označenou

SEQ ID NO:14 a ťažký reťazec s variabilnou doménou označenou SEQ ID NO:16.

124. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 123, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ľahkého reťazca je z kapá variabilnej oblasti ľahkého reťazca.
125. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 123, **vyznačujúci sa tým**, že ľudská variabilná rámcová oblasť ťažkého reťazca je z IgG1 variabilnej oblasti ťažkého reťazca.
126. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 123, **vyznačujúci sa tým**, že variabilná rámcová oblasť ľahkého reťazca je z ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu so sekvenciou ľahkého reťazca 10D5 imunoglobulínu.
127. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 123, **vyznačujúci sa tým**, že variabilná rámcová oblasť ťažkého reťazca je z ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu, ktorý má aspoň 70% identitu so sekvenciou ťažkého reťazca 10D5 imunoglobulínu.
128. Humanizovaný imunoglobulín podľa nároku 123, **vyznačujúci sa tým**, že humanizovaný ľahký reťazec obsahuje komplementaritu určujúce oblasti, ktoré sú identické s zodpovedajúcimi komplementaritu určujúcimi oblasťami myšieho 10D5 ľahkého reťazca, a humanizovaný ťažký reťazec obsahuje komplementaritu určujúce oblasti, ktoré sú identické s zodpovedajúcimi komplementaritu určujúcimi oblasťami myšieho 10D5 ťažkého reťazca.



129. Humanizovaná protilátka obsahujúca komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3) 10D5 variabilnej sekvencie ľahkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:14.
130. Humanizovaná protilátka obsahujúca komplementaritu určujúce oblasti (CDR1, CDR2 a CDR3) 10D5 variabilnej sekvencie ťažkého reťazca uvedenej ako SEQ ID NO:16.
131. Humanizovaná protilátka alebo jej fragment viažuci antigén, ktorý sa špecificky viaže na beta amyloidový peptid (A $\beta$ ), obsahujúca variabilnú oblasť obsahujúcu komplementaritu určujúce oblasti (CDR) zodpovedajúce CDR z myšej 10D5 protilátky.
132. Chimérický imunoglobulín obsahujúci sekvenciu variabilnej oblasti v zásade takú, aká je uvedená v SEQ ID NO:14 alebo SEQ ID NO:16 a sekvencie konštantnej oblasti z ľudského imunoglobulínu.
133. Spôsob prevencie alebo liečby amyloidogénneho ochorenia u pacienta, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa podanie účinnej dávky humanizovaného imunoglobulínu podľa niektorého z nárokov 114 až 131 pacientovi.
134. Spôsob prevencie alebo liečby Alzheimerovej choroby u pacienta, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa podanie účinnej dávky humanizovaného imunoglobulínu podľa niektorého z nárokov 114 až 131 pacientovi.
135. Spôsob podľa nároku 134, **vyznačujúci sa tým**, že účinná dávka humanizovaného imunoglobulínu je 1 mg/kg telesnej hmotnosti.

136. Spôsob podľa nároku 134, **vyznačujúci sa tým**, že účinná dávka humanizovaného imunoglobulínu je 10 mg/kg telesnej hmotnosti.
137. Farmaceutická kompozícia obsahujúca imunoglobulín podľa niektorého z nárokov 114 až 131 a farmaceutický nosič.
138. Izolovaný polypeptid obsahujúci fragment SEQ ID NO:14 vybraný zo skupiny obsahujúcej aminokyseliny 23-38 SEQ ID NO:14, aminokyseliny 54-60 SEQ ID NO:14 a aminokyseliny 93-101 SEQ ID NO:14.
139. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyseliny 23-38 SEQ ID NO:14, aminokyseliny 54-60 SEQ ID NO:14 a aminokyseliny 93-101 SEQ ID NO:14.
140. Izolovaný polypeptid obsahujúci fragment SEQ ID NO:16 vybraný zo skupiny obsahujúcej aminokyseliny 31-37 SEQ ID NO:16, aminokyseliny 52-67 SEQ ID NO:16 a aminokyseliny 100-112 SEQ ID NO:16.
141. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyseliny 31-37 SEQ ID NO:16, aminokyseliny 52-67 SEQ ID NO:16 a aminokyseliny 100-112 SEQ ID NO:16.
142. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:14.

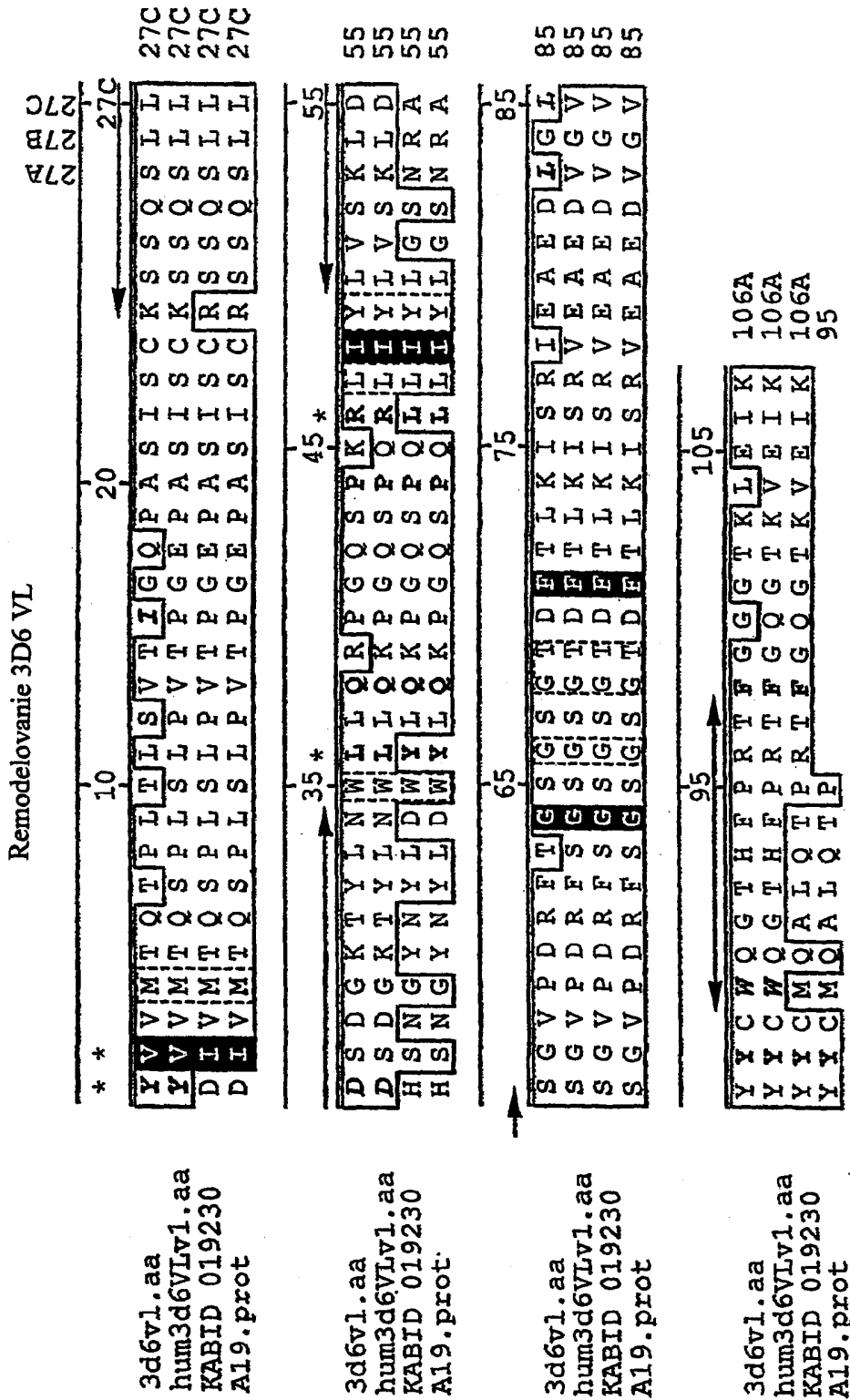
143. Izolovaný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:16.
144. Variant polypeptidu obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:14, pričom uvedený variant obsahuje aspoň jednu konzervatívnu aminokyselinovú substitúciu a zachová si schopnosť priamej špecifickej väzby na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 \text{ M}^{-1}$ .
145. Variant polypeptidu obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:16, pričom uvedený variant obsahuje aspoň jednu konzervatívnu aminokyselinovú substitúciu a zachová si schopnosť priamej špecifickej väzby na beta amyloidový peptid ( $A\beta$ ) s väzbovou afinitou aspoň  $10^7 \text{ M}^{-1}$ .
146. Izolovaný polypeptid obsahujúci zvyšky 1-112 sekvencie aminokyselín SEQ ID NO:14 alebo zvyšky 1-123 sekvencie aminokyselín SEQ ID NO:16.
147. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca ľahký reťazec podľa niektorého z nárokov 84, 86 až 88, 92, 94 a 96 až 98.
148. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca ťažký reťazec podľa niektorého z nárokov 85, 89 až 91, 93 a 99 až 101.
149. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca polypeptid podľa niektorého z nárokov 139 až 146.

150. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny kódujúca imunoglobulín podľa niektorého z nárokov 114 až 132.
151. Izolovaná molekula nukleovej kyseliny obsahujúca sekvenciu nukleotidov SEQ ID NO:13 alebo 15.
152. Vektor obsahujúci molekulu nukleovej kyseliny podľa niektorého z nárokov 147 až 151.
153. Hostiteľská bunka obsahujúca molekulu nukleovej kyseliny podľa niektorého z nárokov 147 až 151.
154. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu zahŕňajúci kultivovanie hostiteľskej bunky podľa nároku 153 za takých podmienok, že sa vyrába táto protilátka alebo fragment, a izolovanie uvedenej protilátky z hostiteľskej bunky alebo kultúry.
155. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu, **vyznačujúci sa tým**, že uvedený spôsob zahŕňa kultivovanie hostiteľskej bunky, ktorá exprimuje molekulu nukleovej kyseliny kódujúcu uvedenú protilátku alebo fragment za takých podmienok, že sa vyrába táto protilátka, a izolovanie uvedenej protilátky z hostiteľskej bunky alebo kultúry, pričom uvedená protilátka alebo fragment obsahujú aminokyseliny 23-38 SEQ ID NO:14, aminokyseliny 54-60 SEQ ID NO:14 a aminokyseliny 93-101 SEQ ID NO:14.
156. Spôsob prípravy protilátky alebo jej fragmentu, **vyznačujúci sa tým**, že uvedený spôsob zahŕňa kultivovanie hostiteľskej bunky, ktorá exprimuje

molekulu nukleovej kyseliny kódujúcu uvedenú protilátku alebo fragment za takých podmienok, že sa vyrába táto protilátka alebo fragment, a izolovanie uvedenej protilátky z hostiteľskej bunky alebo kultúry, pričom uvedená protilátka alebo fragment obsahujú aminokyseliny 31-37 SEQ ID NO:16, aminokyseliny 52-67 SEQ ID NO:16 a aminokyseliny 100-112 SEQ ID NO:16.

157. Spôsob identifikácie zvyškov vhodných na substitúciu vo variabilnej rámcovej oblasti humanizovaného 10D5 imunoglobulínu, zahŕňajúci modelovanie trojrozmernej štruktúry 10D5 variabilnej oblasti, založené na vyriešenej štruktúre imunoglobulínu, a analyzovanie uvedeného modelu na zvyšky schopné ovplyvňovať konformáciu a funkciu variabilnej oblasti 10D5 imunoglobulínu tak, že sa identifikujú zvyšky vhodné na substitúciu.
158. Použitie sekvencie variabilnej oblasti uvedenej ako SEQ ID NO:14 alebo SEQ ID NO:16 alebo nejakej ich časti pri príprave trojrozmerného obrazu 10D5 imunoglobulínu, 10D5 imunoglobulínového reťazca alebo jeho domény.

Obr. 1



Označenie č. 1': Zvyšky v rámci, ktoré presne súhlasia s hum3D6VLv1.aa. Číslovanie zvyškov pozri Kabat.

3d6vl.aa - Donorná myšia sekvencia  
KABID 019230 - ľudská akceptorná rámcová oblasť

hum3d6VLv1.aa - humanizovaná 3d6  
A19.prot - ľudská zárodočná VH

## Obr. 2

## Remodelovanie 3D6 VH

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 3d6vh.aa      | E | V | K | L | V | E | S | G | G | G | L | V | K | P | G | A | S | L | K | L | S | C | A | A | S | G | E | F | T | F | S | N | Y | G | M | S | W | V | R | Q | N | S | D | K | R | L | E | W | V | A | S | 50 |
| hum3d6VHv1.aa | E | V | Q | L | L | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | A | A | S | G | E | F | T | F | S | N | Y | G | M | S | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | S | 50 |
| KABID 045919  | E | V | Q | L | L | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | A | A | S | G | E | F | T | F | S | S | Y | A | V | S | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | S | 50 |
| VH3-23.prot   | E | V | Q | L | L | E | S | G | G | G | L | V | Q | P | G | G | S | L | R | L | S | C | A | A | S | G | E | F | T | F | S | S | Y | A | M | S | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W | V | A | S | 50 |

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| 3d6yh.aa      | I | R | S | G | G | G | R | T | Y | Y | S | D | N | V | K | G | R | F | T | I | S | R | E | N | A | K | N | T | L | Y | L | Q | M | S | L | K | S | E | D | T | A | L | Y | Y | C | V | R | Y | D | 96 |    |
| hum3d6VHv1.aa | I | R | S | G | G | G | R | T | Y | Y | S | D | N | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A | L | Y | Y | C | V | R | Y | D  | 96 |
| KABID 045919  | I | S | G | S | G | G | S | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | A | K | N | S | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A | L | Y | Y | C | A | K | K | 96 |    |
| VH3-23.prot   | I | S | G | S | G | G | S | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T | I | S | R | D | N | S | K | N | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A | L | V | Y | Y | C | A | K | 94 |    |

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 3d6vh.aa      | H | Y | S | G | S | S | - | - | D | Y | W | G | Q | G | T | T | V | T | V | S | S | 110 |
| hum3d6VHv1.aa | H | Y | S | G | S | S | - | - | D | Y | W | G | Q | G | T | T | V | T | V | S | S | 110 |
| KABID 045919  | Y | D | F | W | S | G | T | F | D | Y | W | G | Q | G | T | L | V | T | V | S | S | 113 |
| VH3-23.prot   | Y | D | F | W | S | G | T | F | D | Y | W | G | Q | G | T | L | V | T | V | S | S | 113 |

Označenie č. 1': Zvyšky v rámci, ktoré presne súhlasia s hum3d6VHv1.aa. Číslovanie zvyškov pozri Kabat.

3d6vh.aa - Donorná myšia sekvencia

hum3d6VHv1.aa - humanizovaná 3d6 VH

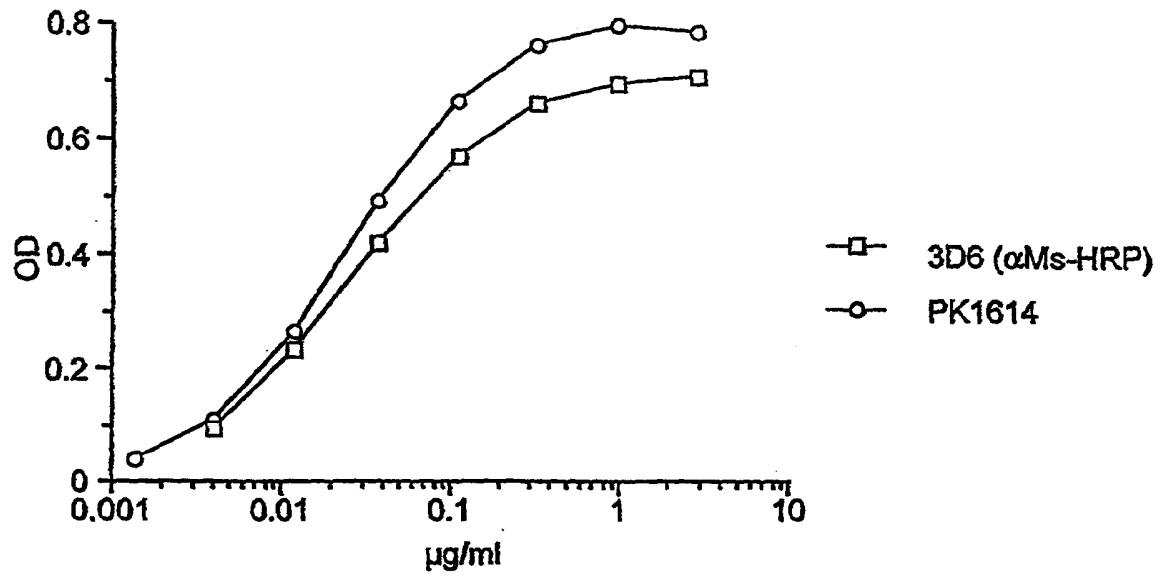
KABID 045919 - ľudská akceptorná rámcová oblasť

VH3-23.prot - ľudská zárodočná VH

3/10

### Obr. 3A

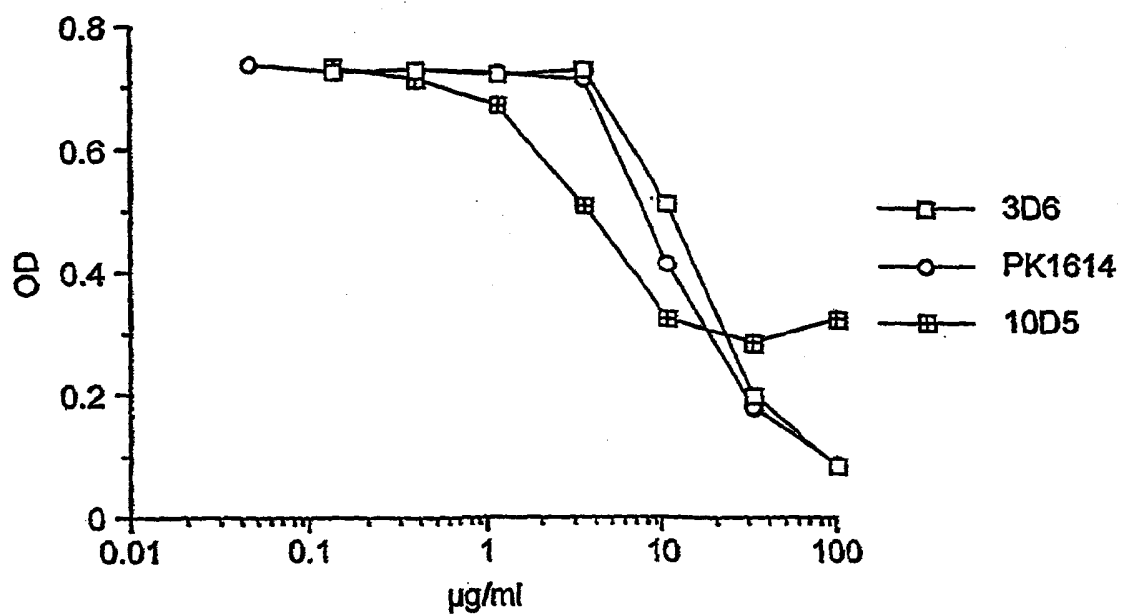
A $\beta$ 42 ELISA



### Obr. 3B

A $\beta$ 42 ELISA

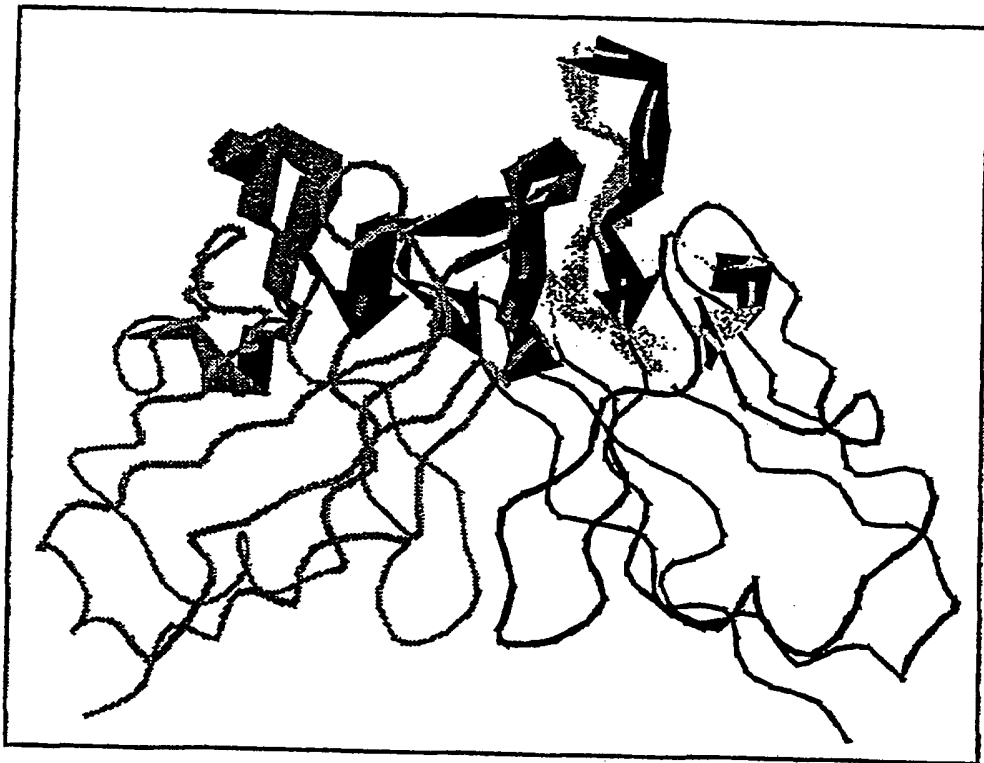
Kompetícia 3D6-B





4/10

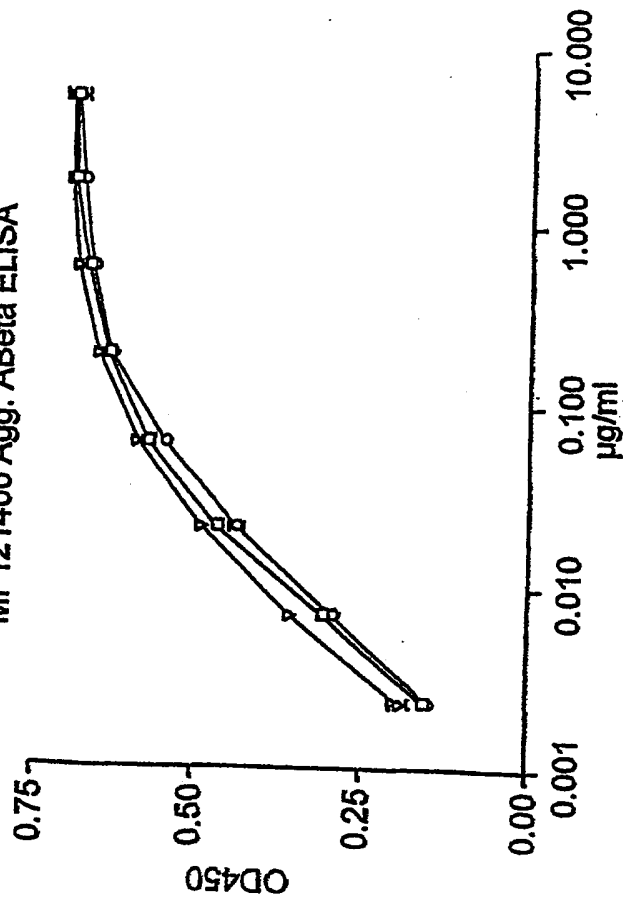
Obr. 4



5/10

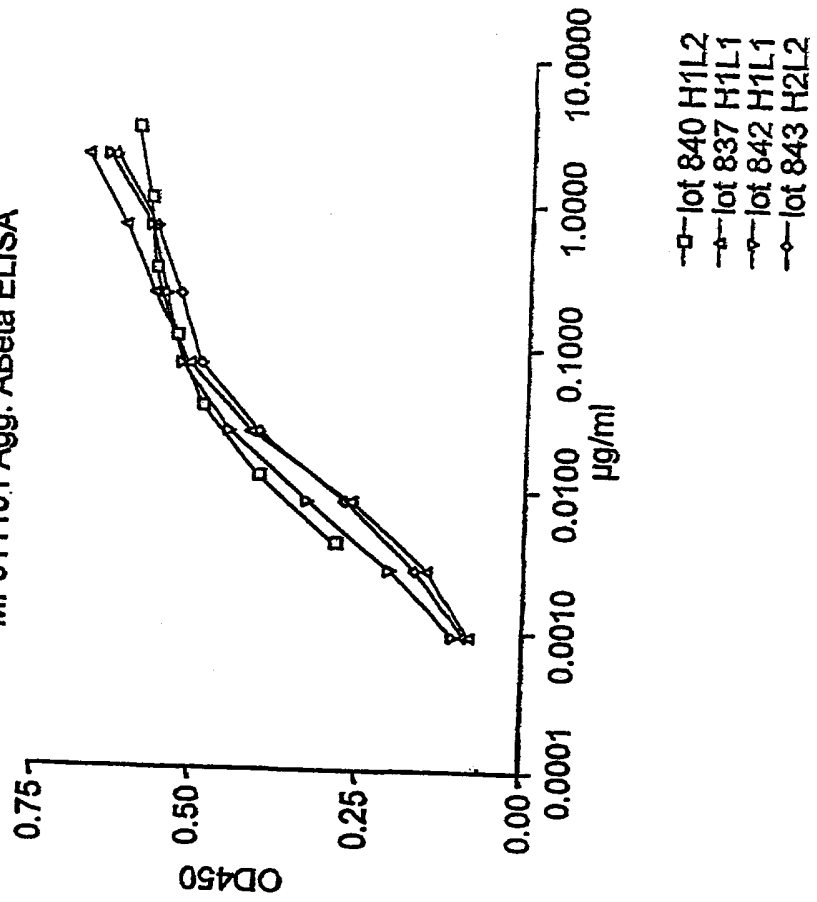
Obr. 5A

MF121400 Agg. ABeta ELISA



Obr. 5B

MF011101 Agg. ABeta ELISA



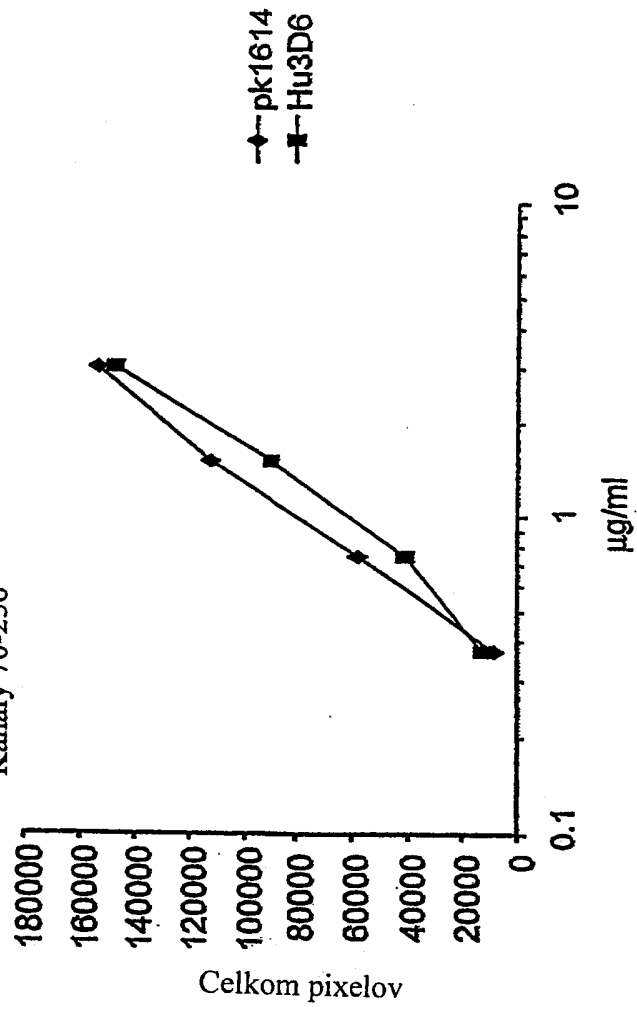
6/10

# Obr. 6

Farbenie PDAPP mozgových rezov z humanizovaným 3D6

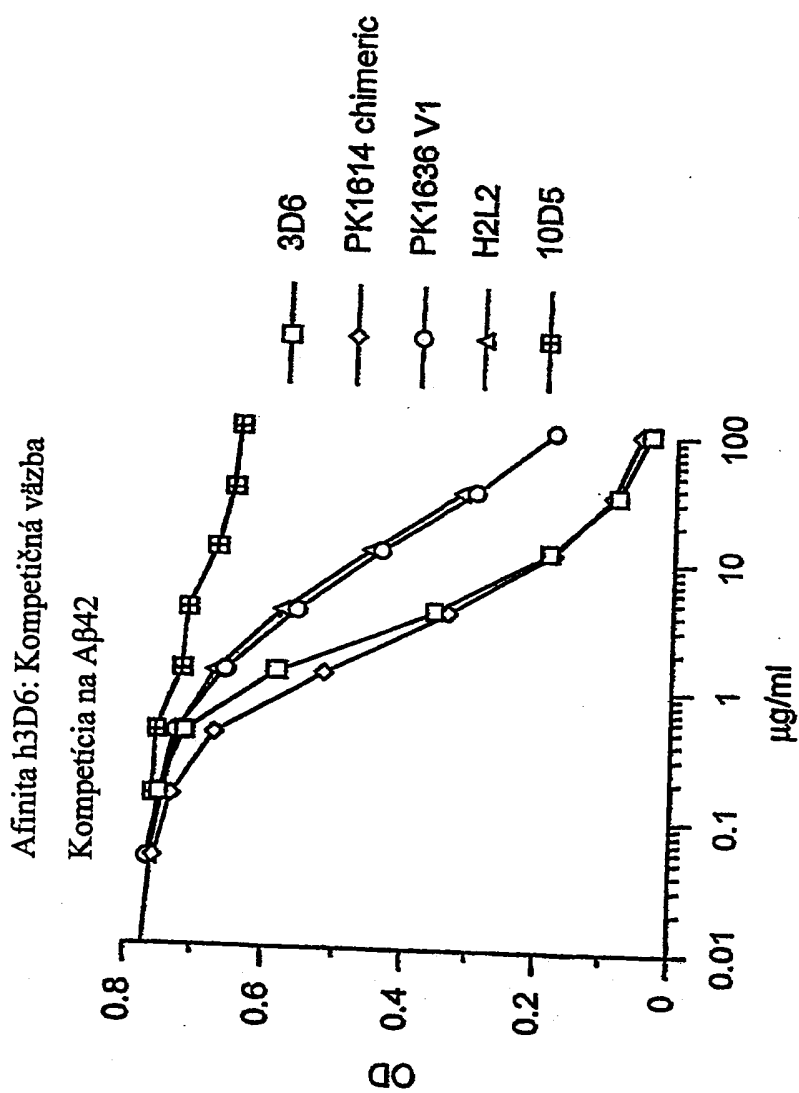
MAB titrácie PD-APP mozgových rezov

Kanály 70-256



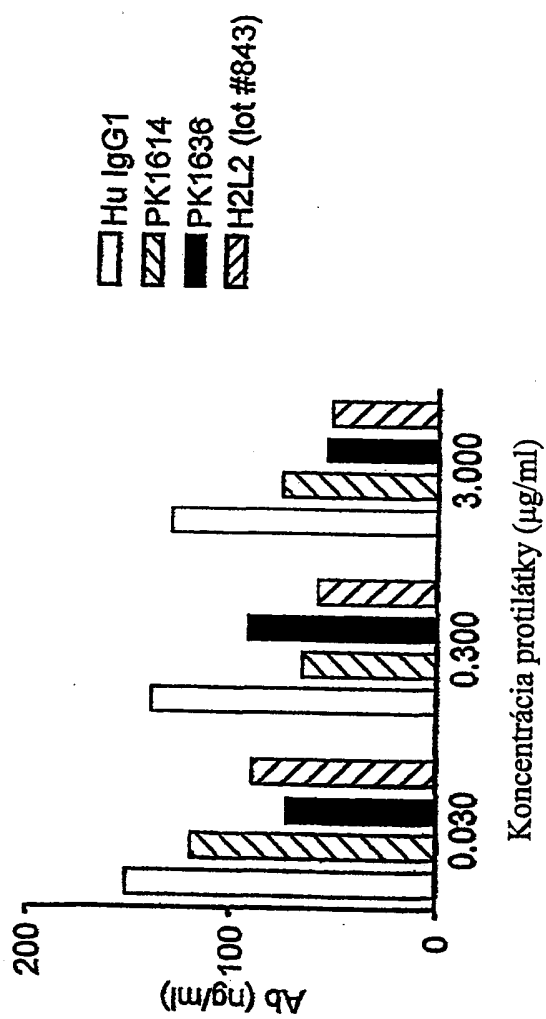
7/10

Obr. 7



**Obr. 8**

Skúška ex-vivo: Stimulácia mikrogliálnej  
fagocytózy pomocou h3D6  
Ex vivo PDAPP  
266/3D6-B



9/10

## Obr. 9

|            |                                                             |     |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----|
| 10D5v1.pro | M K L P V R L L - V L M F W I P A S S S D V L M T Q T P L S | 29  |
| 3D6v1.pro  | M M S P A Q F L F L L V L W I R E T N G Y V V M T Q T P L T | 30  |
|            | 10 20                                                       |     |
|            | 30 40 50                                                    |     |
| 10D5v1.pro | L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N I I H S N G N T Y L E W | 59  |
| 3D6v1.pro  | L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W | 60  |
|            | 60 70 80                                                    |     |
| 10D5v1.pro | Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S | 89  |
| 3D6v1.pro  | L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S | 90  |
|            | 90 100 110                                                  |     |
| 10D5v1.pro | G S G T D F T L K I K K V E A E D L G I Y Y C F Q G S H V P | 119 |
| 3D6v1.pro  | G S G T D F T L K I S R I E A E D L G L Y Y C W Q G T H F P | 120 |
|            | 120 130                                                     |     |
| 10D5v1.pro | L T F G A G T K L E L E                                     | 131 |
| 3D6v1.pro  | R T F G G G T K L E I K                                     | 132 |

|            |                                                             |     |     |    |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
|            | 10                                                          |     | 20  | 30 |
| 10D5vh.pro | M D - R L T S S F L L L I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G | -   |     |    |
| 3D6vh.PRO  | M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G |     |     |    |
|            | 40                                                          | 50  | 60  |    |
| 10D5vh.pro | I L Q S S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R | -   |     |    |
| 3D6vh.PRO  | L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G M - - S W V R |     |     |    |
|            | 70                                                          | 80  | 90  |    |
| 10D5vh.pro | Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L | -   |     |    |
| 3D6vh.PRO  | Q N S D K R L E W V A S I R S G G R T Y Y S D N V K G R F   |     |     |    |
|            | 100                                                         | 110 | 120 |    |
| 10D5vh.pro | T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R | -   |     |    |
| 3D6vh.PRO  | T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R |     |     |    |
|            | 130                                                         | 140 |     |    |
| 10D5vh.pro | R P I T P V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S             | -   |     |    |
| 3D6vh.PRO  | - - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T T V T V S S             |     |     |    |