

Ця заявка проголошує переваги попередньо зареєстрованої патентної заявки, США, серійний No.60/363,751 (подано 12 березня, 2002), під назвою "Гуманізовані антитіла, які розпізнають бета амілоїдний пептид" (перебуває на розгляді). Весь зміст вищезазначеної заявки наведений тут у вигляді довідкової інформації.

Хвороба Альцгеймера (ХА) - це прогресуюче захворювання, що призводить до сенільної деменції. Див. Selkoe, TINS 16:403 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53: 438 (1994); Duff et al., Nature 373: 476 (1995); Games et al., Nature 373: 523 (1995). В широкому розумінні, хвороба має 2 форми: пізню форму, яка розпочинається в похилому віці (після 65 років), і ранню, яка розвивається задовго до настання сенільного періоду, від 35 до 65 років.

В обох формах хвороби, патологія однакова, однак порушення більш серйозні і поширені у випадку, коли захворювання розпочинається в молодшому віці. Хвороба характеризується щонайменше двома типами уражень мозку - утворенням нейрофібрилярних сплетьонів і сенільних бляшок. Нейрофібрилярні сплетьонні утворені внутрішньоклітинними відкладеннями мікротрубочок, зв'язаних тау протеїном, що складається з двох ниток, скручених одна з однією в пари. Сенільні бляшки (тобто, амілоїдні бляшки) являють собою області дезорганізованого нейропілю до 150µm в діаметрі з екстрацелюлярними амілоїдними відкладеннями в центрі, які видно при мікроскопічному вивченні зрізів мозкової тканини. Накопичення амілоїдних бляшок в мозку пов'язане також з синдромом Дауна та іншими когнітивними розладами.

Основним компонентом амілоїдних бляшок є пептид, названий Аβ або β-амілоїдний пептид. Аβ-пептид є внутрішній фрагмент з молекулярною масою 4-kDa, утворений 39-43 амінокислотами більшого трансмембранного глікопротеїну, зазначеного білка, який називається попередником амілоїдного білка (APP - amyloid precursor protein). Внаслідок протеолітичного процесингу APP різними секретазними ферментами, Аβ головним чином виявляється в двох формах - короткій, утвореній 40 амінокислотними залишками, і довгій, - в утворенні якої беруть участь 42-43 амінокислотні залишки.

Частина гідрофобного трансмембранного домену APP виявлена на карбоксильному кінці Аβ і може відповідати за здатність Аβ агрегуватись в бляшки, зокрема, у випадку, коли йдеться про довгу форму. Накопичення амілоїдних бляшок в мозку в кінцевому результаті призводить до загибелі нервових клітин. Фізичні симптоми, пов'язані з цим типом ушкодження мозку, характеризують хворобу Альцгеймера.

Був встановлений зв'язок між виникненням кількох мутацій APP білка і наявністю хвороби Альцгеймера. Див. e.g., Goate et al., Nature 349: 704 (1991) (валін⁷¹⁷ на ізолейцин); Chartier Harlan et al. Nature 353: 844 (1991) (валін⁷¹⁷ на гліцин); Murrell et al., Science 254: 97 (1991) (валін⁷¹⁷ на фенілаланін); Mullan et al., Nature Genet. 1: 345 (1992) (подвійна мутація, яка змінює лізин⁵⁹⁵-метіонін⁵⁹⁶ на аспарагін⁵⁹⁵-лейцин⁵⁹⁶). Вважають, що такі мутації викликають хворобу Альцгеймера за рахунок зростання або зміни процесингу APP до Аβ, зокрема процесингу APP, який супроводжується збільшенням кількості довгої форми Аβ (тобто, Аβ1-42 і Аβ1-43). Вважають, що мутації в інших генах, таких як пресенілін гени, PS1 і PS2, опосередковано впливають на процесинг APP, що призводить до збільшення кількості довгої форми Аβ (див. Hardy, TINS 20: 154(1997)).

Для того щоб з'ясувати значення амілоїдних бляшок у виникненні хвороби Альцгеймера, як моделі успішно використовуються миші (Games et al., supra, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1550 (1997)). Зокрема, коли PDAPP трансгенним мишам (які експресують мутантну форму APP людини і зумовлюють розвиток хвороби Альцгеймера у молодому віці), вводили довгу форму Аβ, вони виявляли як зменшення розвитку хвороби Альцгеймера, так і зменшення титру антитіл до Аβ пептиду (Schenk et al., Nature 400,173 (1999)). Результати спостережень, які обговорювались вище, показують, що Аβ, особливо його довга форма, є одним з чинників, що зумовлюють розвиток хвороби Альцгеймера.

Таким чином, існує потреба в опрацюванні нових видів терапії і препаратів для лікування хвороби Альцгеймера, зокрема, терапії і препаратів, здатних виявляти позитивний терапевтичний ефект в фізіологічних (наприклад, нетоксичних) дозах.

Даний винахід відрізняється новими імунологічними препаратами, зокрема терапевтичними препаратами антитіл для профілактики і лікування амілоїдогенної хвороби (наприклад, хвороби Альцгеймера). Винахід оснований, принаймні частково, на ідентифікації і визначенні характерних особливостей моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з Аβ-пептидом і є ефективним у зменшенні накопичення бляшок і/або зменшенні невритичної дистрофії, пов'язаної з амілоїдогенними розладами. Структурний і функціональний аналіз цього антитіла призвів до створення різних "гуманізованих" антитіл для використання з метою профілактики і/або лікування захворювання. Зокрема, винахід відрізняється "гуманізацією" варіабельних областей цього антитіла і, відповідно, передбачає "гуманізований" імуноглобулін або ланцюги антитіла, інтактний "гуманізований" імуноглобулін чи антитіла, і функціональні фрагменти імуноглобуліну чи антитіла, зокрема, антигензв'язуючі фрагменти, що належать цьому антитілу.

Поліпептиди, що включають ділянки, які визначають комплементарність до антигену, представленого моноклонального антитіла, також були виявлені, а також поліпептиди, вектори і клітини-господарі, придатні для кодування названих поліпептидів.

Розкрито методи лікування амілоїдогенних хвороб чи розладів (наприклад, хвороби Альцгеймера), а також фармацевтичні композиції і набір реактивів для використання в цих заявках.

Винахід також відрізняється за методами ідентифікації залишків в межах представлених моноклональних антитіл, які є важливими для належного імунологічного функціонування і для ідентифікації залишків, що здатні до заміни при створенні гуманізованих антитіл, які мають підвищену зв'язуючу спорідненість і/або знижену імуногенність, коли використовуються як терапевтичні препарати.

Також представлені антитіла - це антитіла (наприклад, гуманізовані антитіла), які мають змінені ефекторні функції і їх терапевтичне використання.

Fig.1A-B зображує порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей легкого ланцюга 12B4 миші (зрілий пептид, SEQ ID NO:2), гуманізованого 12B4 (зрілий пептид, SEQ ID NO:6), Kabat ID 005036 (зрілий пептид, SEQ ID NO:32) і гаметної лінії A19 (X63397, зрілий пептид, SEQ ID NO:30) антитіл. (CDR-ділянки виділені пунктиром і суцільною лінією). Єдина зворотна мутація залишку людина→миша позначена зірочкою. Значення

заштрихованих залишків показане в легенді. Відлік ведеться від першого метіоніну, а не у відповідності з Kabat-нумерацією.

Фіг.2A-B зображує порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей важкого ланцюга 12B4 миші (зрілий пептид, SEQ ED NO:4), гуманізованого 12B4 (версія 1) (зрілий пептид, SEQ ID NO:8), Kabat ID 000333 (зрілий пептид, SEQ ID NO:34), і гаметної лінії VH4-39 і VH4-61 антитіл (зрілі пептиди, SEQ ID NOs: 38 і 36, відповідно). Анотація та ж, що й до Фіг.1. Відлік ведеться від першого метіоніну, а не у відповідності з Kabat-нумерацією.

Фіг.3A-D зображує нуклеотидну і амінокислотну послідовність для гуманізованого 12B4VLv1 у порівнянні з химерним 12B4VL (ідентична послідовність варіабельної області мишачого 12B4VL, SEQ ED NOs 1 і 2, відповідно); послідовність гаметної лінії A19 (SEQ ID NOs: 29 і 30, відповідно); і Kabid ID 005036 (SEQ ID NOs: 31 і 32, відповідно).

Фіг.4A-D зображує нуклеотидну і амінокислотну послідовність для гуманізованого 12B4VLv1 у порівнянні з химерним 12B4VH (ідентична послідовність варіабельної області мишачого 12B4VH, SEQ ED NOs: 3 і 14, відповідно); Kabat ID 000333 (SEQ ID NOs 33 і 34, відповідно); і гаметної лінії VH4-61 (SEQ ED NOs: 35 і 36, відповідно).

Фіг.5 графічно зображує результати ELISA-тесту з двох незалежних експериментів, пов'язаних з визначенням здатності химерних антитіл 12B4, 3D6, і химерного 3D6 зв'язувати A β (панелі A і B, відповідно).

Фіг.6 графічно зображує конкурентне ELISA зв'язування, яке підтверджує функціональну активність 12B4 і химерного 12B4 у порівнянні з 3D6, химерними 3D6, і 10D5. Химерне антитіло 12B4 (відкриті трикутники) конкурує з однаковою ефективністю з його небіотинільованим мишачим "двійником" (відкриті перевернуті трикутники) за зв'язування біотинільованого мишачого 12B4 з A β 442 пептидом.

Фіг.7 графічно зображує результати дослідження фагоцитозу *ex vivo*, які визначають здатність химерних 12B4, 3D6, і IgG1 людини бути проміжною ланкою в поглинанні A β мікрогліальними клітинами на зрізах мозку мишей PDAPP лінії.

Фіг.8 графічно зображує результати двох незалежних досліджень фагоцитозу *ex vivo* (панель A і B, відповідно), які визначають здатність химерного 12B4, гуманізованого 3D6, і IgG1 людини бути проміжною ланкою в поглинанні A β мікрогліальними клітинами на зрізах мозку хворих на хворобу Альцгеймера.

Фіг.9 є схематичним зображенням PCR-опосередкованого збирання гуманізованого 12B4, версія 1. Фіг.9A зображує збирання VL-областей. Фіг.9B зображує збирання VH-областей.

Даний винахід представляє нові імунологічні препарати і методи для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера чи інших амілоїднотенних захворювань. Винахід оснований, принаймні частково, на визначенні характерних особливостей моноклонального імуноглобуліну, 12B4, ефективного при зв'язуванні бета-амілоїдного білка (A β) (наприклад, здатного зв'язувати розчинний і/або агрегований A β), здатного брати опосередковану участь у фагоцитозі (наприклад, агрегованих A β), зменшувати кількість бляшок і/або зменшувати невритичну дистрофію (наприклад, у пацієнта). Винахід, крім того, оснований на визначенні і структурній характеристиці первинної і вторинної структури варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів 12B4 імуноглобуліну і ідентифікації залишків, важливих для активності і імуногенності.

Представлені імуноглобуліни - це імуноглобуліни, які включають варіабельний легкий і/або варіабельний важкий ланцюг 12B4 моноклонального імуноглобуліну, описаного тут. Перевага віддається імуноглобулінам, наприклад, терапевтичним імуноглобулінам, представленим у винаході, які включають гуманізований варіабельний легкий і/або гуманізований варіабельний важкий ланцюг. Надано перевагу варіабельному легкому і/або варіабельному важкому ланцюгам, які включають ділянку, що визначає комплементарність до антигену (CDR), 12B4 імуноглобуліну (наприклад, донорного імуноглобуліну) і варіабельні каркасні ділянки, головним чином, з акцепторного імуноглобуліну людини. Вислів "головним чином з акцепторного імуноглобуліну людини" означає, що більшість або основні залишки каркасної ділянки походять з акцепторної послідовності людини, що, однак, робить можливим, заміну залишків в певних позиціях залишками, відібраними для того, щоб підвищити активність гуманізованого імуноглобуліну (наприклад, змінити активність таким чином, щоб вона повніше імітувала активність донорного імуноглобуліну) або відібраних для того, щоб зменшити імуногенність гуманізованого імуноглобуліну.

В одному втіленні, винахід представляє гуманізований імуноглобулін, легкий і важкий ланцюг якого включає ділянки, що визначають комплементарність до антигену (CDR), варіабельної області 12B4 (тобто, включає одну, дві або три CDR-ділянки з набору послідовностей варіабельної області легкого ланцюга, який далі називається як SEQ ID NO:2 або включає одну, дві або три CDR-ділянки з набору послідовностей варіабельної області важкого ланцюга, який далі називається як SEQ ID NO:4), і включає варіабельну каркасну ділянку головним чином з послідовності легкого або важкого ланцюгів акцепторного імуноглобуліну людини, передбачаючи, що, принаймні, один залишок утворюється внаслідок зворотної мутації до відповідного мишачого залишку, де вказана зворотна мутація істотно не впливає на здатність ланцюга до зв'язування A β .

В іншому втіленні, винахід представляє гуманізований імуноглобулін, легкий і важкий ланцюги якого включають ділянки, які визначають комплементарність до антигену (CDR), варіабельної області 12B4 (наприклад, включають одну, дві або три CDR-ділянки з набору послідовностей варіабельної області легкого ланцюга, який далі називається як SEQ ID NO:2 і/або включає одну, дві або три CDR-ділянки з набору послідовностей варіабельної області важкого ланцюга, далі - SEQ ID NO:4), і включає варіабельну каркасну ділянку, головним чином, з послідовності легкого або важкого ланцюга акцепторного імуноглобуліну людини, передбачаючи, що, принаймні, хоч один залишок з каркасної ділянки замінюється відповідним амінокислотним залишком з послідовності легкого або важкого ланцюга 12B4 миші, де залишок з каркасної частини обирається з групи, яка складається з (а) залишка, який нековалентно прямо зв'язується з антигеном; (б) залишка, прилеглого до CDR; (с) залишка, який взаємодіє з CDR (наприклад, визначеного шляхом моделювання легкого і важкого ланцюга на розшифрованій структурі ланцюга гомологічного відомого імуноглобуліну); і (d) залишка, який бере участь в утворенні поверхні розділу VL-VH.

В іншому варіанті, винахід представляє гуманізований імуноглобулін, легкий або важкий ланцюг якого включає CDR-ділянки варіабельної області 12B4 і варіабельні каркасні ділянки послідовності легкого або важкого ланцюга акцепторного імуноглобуліну людини, передбачаючи, що, принаймні, хоч один залишок з каркасної ділянки замінюється відповідним амінокислотним залишком з послідовності варіабельної області легкого або важкого ланцюга 12B4 миші, де залишок з каркасної частини є залишком, що здатний впливати на структуру варіабельної області легкого ланцюга або його функцію, як було визначено шляхом аналізу тримірної моделі варіабельної області, наприклад, що залишок, здатний взаємодіяти з антигеном, займає проксимальну позицію щодо антигензв'язуючого центра; залишок, здатний взаємодіяти з CDR, - це той залишок, що прилеглий до CDR, залишок, який знаходиться на відстані 6Å від CDR залишка, канонічний залишок, залишок зони Верньє, внутрішньоланцюговий пакувальний залишок, рідкісний залишок, або залишок центра гліколізації на поверхні структурної моделі.

В іншому втіленні, винахід представляє, крім заміни, які було описано вище, заміну, принаймні, одного рідкісного "людського" залишку каркасної частини. Наприклад, рідкісний залишок може бути заміщений амінокислотним залишком, який є звичайним для послідовності варіабельного ланцюга людини в цій позиції. В альтернативному варіанті, рідкісний залишок може бути замінений відповідним амінокислотним залишком з гомологічної послідовності варіабельного ланцюга гаметної лінії.

В іншому втіленні, винахід представляє гуманізований імуноглобулін, який включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, як було описано вище, або антигензв'язуючий фрагмент вказаного імуноглобуліну. В типовому втіленні, гуманізований імуноглобулін зв'язує (наприклад, специфічно зв'язує) бета-амілоїдний пептид (A β) із зв'язуючим афінитетом, принаймні, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, або $10^9 M^{-1}$. В іншому втіленні, імуноглобулін або антигензв'язуючий фрагмент включає важкий ланцюг, який має ізотип $\gamma 1$. В іншому втіленні, імуноглобулін або антигензв'язуючий фрагмент зв'язує (наприклад, специфічно зв'язує) як розчинний бета-амілоїдний пептид (A β), так і агрегований A β . В іншому втіленні, імуноглобулін або антигензв'язуючий фрагмент є посередниками фагоцитозу (наприклад, індують фагоцитоз) бета-амілоїдний пептиду (A β). В ще одному втіленні, імуноглобулін або антигензв'язуючий фрагмент долають гематоенцефалічний бар'єр суб'єкта. В ще одному втіленні, імуноглобулін або антигензв'язуючий фрагмент зменшує як накопичення бета-амілоїдний пептиду (A β), так і невритичну дистрофію у суб'єкта.

В іншому втіленні, винахід представляє химерні імуноглобуліни, які включають варіабельні області 12B4 (наприклад, послідовності варіабельної області, далі SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4). В ще одному втіленні, імуноглобулін або його антигензв'язуючий фрагмент, крім того, включає константні області з IgG1.

Імуноглобуліни, описані в цьому винаході, особливо придатні для використання в терапевтичних методах, які мають на меті профілактику або лікування амілоїдних захворювань. В одному втіленні, винахід представляє метод профілактики або лікування амілоїдного захворювання (наприклад, хвороби Альцгеймера), який стосується введення пацієнтові ефективної дози гуманізованого імуноглобуліну, як тут описано. В іншому втіленні, винахід представляє фармацевтичні композиції, які включають гуманізований імуноглобулін, як тут описано, і фармацевтичний носій. Також представлені ізолявані молекули нуклеїнової кислоти, вектори і клітини-господарі для отримання імуноглобулінів або фрагментів, або ланцюгів імуноглобулінів, як тут описано, а також методи для отримання вказаних імуноглобулінів, фрагментів або ланцюгів імуноглобуліну.

Даний винахід також представляє метод для ідентифікації залишків 12B4, які підлягають заміні при отриманні гуманізованого 12B4 імуноглобуліну, відповідно. Наприклад, метод для ідентифікації каркасних залишків варіабельної області, які підлягають заміні, включає моделювання тримірної структури варіабельної області 12B4 на основі структури розшифрованого гомологічного імуноглобуліну і аналіз вказаної моделі щодо наявності залишків, здатних впливати на конформацію або функцію варіабельної області 12B4 імуноглобуліну, внаслідок чого ідентифікуються залишки, які підлягають заміні. Крім того, винахід представляє використання послідовностей варіабельної області, далі SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4, або будь-якої її частини, для отримання тримірного "внутрішнього образу" 12B4 імуноглобуліну, ланцюга 12B4 імуноглобуліну, або його домену.

Крім того, даний винахід представляє імуноглобулін, який має змінені ефекторні функції, такі як здатність зв'язувати ефекторні молекули, наприклад, комплемента або рецептора на ефекторній клітині. Зокрема, імуноглобулін даного винаходу має змінену константну область, наприклад, Fc-область, де щонайменше один амінокислотний залишок в Fc-області замінений іншим залишком або бічним ланцюгом. В одному втіленні, модифікований імуноглобулін є імуноглобуліном IgG класу, включає, принаймні, заміну одного амінокислотного залишку Fc-області, внаслідок чого імуноглобулін має змінені ефекторні функції, наприклад, у порівнянні з немодифікованим імуноглобуліном. В окремих втіленнях, імуноглобулін даного винаходу має змінені ефекторні функції, внаслідок чого він є менш імуногенним (наприклад, не викликає небажаної активності ефекторних клітин, лізису, або зв'язування комплемента), має посилену здатність до кліренсу амілоїдний, і/або має бажаний час напіврозпаду.

Перед описом винаходу, для того щоб зрозуміти його, має бути корисним навести визначення певних термінів, які будуть використані надалі.

Термін "імуноглобулін" або "антитіло" (використовуються поперемінно тут) стосується білка, який має основну структуру, утворену чотирма поліпептидними ланцюгами - двома легкими і двома важкими, вказані ланцюги стабілізуються, наприклад, за рахунок утворення між ланцюгами дисульфідних зв'язків, які мають здатність специфічно зв'язувати антиген. Термін "одноланцюговий імуноглобулін" або "одноланцюгове антитіло" (використовуються поперемінно тут) стосується білка, структура якого утворена ланцюгом, що включає два поліпептиди, важкий і легкий ланцюг, вказані ланцюги стабілізуються, наприклад, за рахунок існування між пептидними ланцюгами лінкерів, які мають здатність специфічно зв'язувати антиген. Термін "домен" стосується глобулярної області важкого або легкого поліпептидного ланцюга, яка включає пептидні "петлі" (наприклад, включає від 3 до 4 пептидних петель), стабілізовані, наприклад, β -складчастою конформацією і/або дисульфідними зв'язками всередині ланцюга. Домени далі називаються тут як "константні"

або "варіабельні", на підставі відносної втрати здатності послідовності до мінливості всередині доменів представників різних класів у випадку "константного" домену, або значної мінливості всередині доменів представників різних класів у випадку "варіабельного" домену. Терміни антитіло або поліпептидні "домени" часто використовуються у винаході поперемінно як антитіло або поліпептидні "області". "Константні" домени легкого ланцюга антитіла називаються поперемінно як "константні області легкого ланцюга", "константні домени легкого ланцюга", "CL" області або "CL" домени. "Константні" домени важкого ланцюга антитіла називаються поперемінно як "константні області важкого ланцюга", "константні домени важкого ланцюга", "CH" області, або "CH" домени. "Варіабельні" домени легкого ланцюга антитіла називаються поперемінно як "варіабельні області легкого ланцюга", "варіабельні домени легкого ланцюга", "VL" області або "VL" домени). "Варіабельні" домени важкого ланцюга антитіла називаються поперемінно як "варіабельні області важкого ланцюга", "варіабельні домени важкого ланцюга", "CH" області або "CH" домени).

Термін "ділянка" також може стосуватись частини або порції ланцюга антитіла або домену ланцюга антитіла (наприклад, частини або порції важкого або легкого ланцюга або частини чи порції константного або варіабельного домену, як визначено тут), а також більш дискретних частин або порцій вказаних ланцюгів або доменів. Наприклад, легкий і важкий ланцюги або варіабельні домени легкого і важкого ланцюгів включають "ділянки, які визначають комплементарність" або "CDR" чергуються з "ділянками каркасної частини" або "FR", як тут визначено.

Імуноглобуліни або антитіла можуть існувати в мономерній або полімерній формі, наприклад, IgM антитіла, які існують в пентамерній формі і/або IgA антитіла, які існують в мономерній, димерній або мультимерній формі. Термін "фрагмент" стосується частини або порції антитіла або ланцюга антитіла, яка включає менше число амінокислотних залишків, ніж інтактне або повне антитіло або ланцюг антитіла. Фрагменти можуть бути отримані шляхом хімічної або ферментативної обробки інтактного або повного антитіла або ланцюга антитіла.

Фрагменти також можуть бути отримані за допомогою рекомбінантних засобів. Типові фрагменти включають Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc і/або Fv фрагменти. Термін "антигензв'язуючий фрагмент" стосується поліпептидного фрагменту імуноглобуліну або антитіла, який зв'язує антиген або конкурує з інтактним антитілом (наприклад, з інтактним антитілом, від якого вони походять) за зв'язування антигена (наприклад, специфічне зв'язування).

Термін "конформація" стосується третинної структури білка або поліпептиду (наприклад, антитіла, ланцюга антитіла, домену або його ділянки). Наприклад, фраза "конформація легкого (або важкого) ланцюга" стосується третинної структури варіабельної області легкого (або важкого) ланцюга, а фраза "конформація антитіла" або "конформація фрагменту антитіла" стосується третинної структури антитіла або його фрагменту.

"Специфічне зв'язування" антитіла означає, що антитіло виявляє істотну спорідненість до антигену або певного епітопу і, здебільшого, не виявляє значної перехресної реактивності. "Істотне" або краще зв'язування включає зв'язування з афінністю, принаймні, 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9M^{-1} , або 10^{10}M^{-1} . Бажано, щоб афінність була більша, ніж 10^7M^{-1} , особливо більша, ніж 10^8M^{-1} . Значення, проміжні між вказаними величинами, будуть також розглянуті в межах даного винаходу і найкраща зв'язуюча афінність може бути визначена як низка значень афінності, наприклад, від 10^6 до 10^{10}M^{-1} , бажано, від 10^7 до 10^{10}M^{-1} , ще більш бажано - від 10^8 до 10^{10}M^{-1} . Антитіло, яке не виявляє значної зворотної реактивності" є антитіло, яке не буде істотно зв'язуватись з небажаним об'єктом (наприклад, небажаним об'єктом білкової природи). Наприклад, антитіло, яке специфічно зв'язує Aβ, буде істотно зв'язуватись з Aβ, але не буде істотно реагувати з не-Aβ протеїнами або пептидами (наприклад, не-Aβ протеїнами або пептидами, які входять до складу бляшок). Антитіло, специфічне по відношенню до певного епітопу, не буде, наприклад, значно зворотно реагувати з віддаленими епіталами на тому ж білку або пептиді. Специфічне зв'язування може бути визначене відповідно до будь-яких загальноприйнятих в імунології засобів для визначення такого зв'язування. Переважно, специфічне зв'язування визначається за допомогою Scatchard-аналізу і/або аналізу конкурентного зв'язування.

Зв'язуючі фрагменти отримують за допомогою методики рекомбінантних ДНК, або ферментативного чи хімічного розщеплення інтактних імуноглобулінів. Зв'язуючі фрагменти включають Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, одинарні ланцюги і однокланові антитіла. Інші, ніж "біспецифічні" або "біфункціональні (гетеровалентні)" імуноглобуліни або антитіла, імуноглобулін або антитіло розшифровуються для того щоб мати ідентичні їх зв'язуючі центри. "Біспецифічні" або "біфункціональні антитіла" - це штучні гібридні антитіла, які мають дві різні (важкий/легкий) пари ланцюгів і два різних зв'язуючих центри. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані за допомогою цілої низки методів, включаючи злиття гібридом або зшивання Fab' фрагментів. Див., наприклад, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Термін "гуманізований імуноглобулін" або "гуманізоване антитіло" стосується імуноглобуліну або антитіла, яке включає, принаймні, один ланцюг гуманізованого імуноглобуліну або антитіла (наприклад, принаймні, один гуманізований легкий або важкий ланцюг). Термін "ланцюг гуманізованого імуноглобуліну" або "ланцюг гуманізованого антитіла" (наприклад, легкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну) стосується ланцюга імуноглобуліну або антитіла (наприклад, легкого або важкого ланцюга, відповідно), який має варіабельну область, що включає варіабельну каркасну ділянку, головним чином, з імуноглобуліну або антитіла людини і ділянки, які визначають комплементарність до антигена (CDR-ділянки) (наприклад, принаймні одну CDR, бажано дві CDR, ще більш бажано три CDR), головним чином з імуноглобуліну або антитіла, що не належать людині, і, до того ж, включає константні області (наприклад, принаймні, одну константну область або її частину, у випадку легкого ланцюга, і переважно, три константні області, якщо йдеться про важкий ланцюг). Термін "гуманізована варіабельна область" (наприклад, "варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга" або "варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга") стосується варіабельної області, яка включає варіабельну каркасну ділянку, головним чином з імуноглобуліну або антитіла людини і ділянки, які визначають комплементарність до антигена (CDR-ділянки), головним чином з імуноглобуліну або антитіла, що не належать людині.

Фраза "головним чином з імуноглобуліну або антитіла людини" або "головним чином, людський" означає,

що, коли провести порівняльний аналіз первинної структури імуноглобуліну або антитіла людини, ділянка виявляє принаймні 80-90%, бажано, принаймні 90-95%, ще більш бажано, принаймні, 95-99% ідентичності (наприклад, локальної ідентичності послідовності) з послідовністю каркасної частини або константної області молекули імуноглобуліну людини, що робить можливим, наприклад, консервативні заміни, заміни консенсусної послідовності, заміни послідовності гаметної лінії, зворотні мутації тощо. Введення консервативних заміни, заміни в консенсусній послідовності, заміни в гаметній послідовності, зворотні мутації, і тому подібне, часто називається як "оптимізація" гуманізованого антитіла або ланцюга. Фраза "головним чином з імуноглобуліну або антитіла, що не належать людині" або "головним чином, нелюдський" означає, що послідовність амінокислот імуноглобуліну або антитіла, принаймні, на 80-95%, бажано, принаймні, на 90-95%, ще більш бажано, на 96%, 97%, 98%, або 99% ідентична послідовності організму не людини, наприклад, іншого ссавця.

Відповідно, всі ділянки або залишки гуманізованого імуноглобуліну або антитіла, або ланцюга гуманізованого імуноглобуліну або антитіла, за винятком, можливо, CDR-ділянок, головним чином, ідентичні відповідним ділянкам або залишком однієї або кількох послідовностей нативного імуноглобуліну людини. Термін "відповідна ділянка" або "відповідний залишок" стосується ділянки або залишку на іншій амінокислоті або нуклеотидній послідовності, яка займає те ж саме (тобто, ідентичне) положення, що й ділянка або залишок першої амінокислоти або нуклеотидної послідовності, коли здійснюється порівняльний аналіз першої і другої послідовностей.

Термін "істотна ідентичність" означає, що дві нуклеотидні послідовності, при оптимальному порівняльному аналізі, який здійснюється за допомогою програм GAP або BESTFIT з використанням по умовчання різниці ваги, ідентичні, принаймні, на 50-60%, бажано, принаймні, на 60-70%, ще більш бажано, принаймні, на 70-80%, бажаніше, принаймні на 80-90%, навіть ще бажаніше, принаймні, на 90-95%, і навіть ще бажаніше, принаймні, на 95% чи ще більше (наприклад, 99% ідентичності послідовності чи більше). Термін "істотна ідентичність" означає, що дві поліпептидні послідовності, при оптимальному порівняльному аналізі, наприклад, такому, що здійснюється за допомогою програм GAP або BESTFIT з використанням по умовчання різниці ваги, виявляють, принаймні, 80-90% ідентичності послідовності, бажано, принаймні, 90-95% ідентичності послідовності, і ще більш бажано, принаймні, 95% ідентичності послідовності чи ще більше (наприклад, 99% ідентичності послідовності або більше). Для порівняння послідовності, як правило, одна послідовність слугує еталоном, з яким порівнюються досліджувані послідовності. При використанні алгоритму порівняння послідовностей, досліджувані і етальонні послідовності вводяться в комп'ютер, вказуються координати підпослідовностей, якщо необхідно, і визначаються параметри програми алгоритмічної послідовності. Алгоритм порівняння послідовності далі підраховує відсоток ідентичності досліджуваних послідовностей(тей) відносно етальонної послідовності, базуючись на параметрах зазначеної програми.

Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути виконано, наприклад, з використанням алгоритму локальної гомології Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), алгоритму гомології вирівнювання Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), методу пошуку подібності Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), комп'ютеризованим виконанням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, і TFASTA з пакету програмного забезпечення Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), або шляхом візуального обстеження (див. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology). Як приклад алгоритму, придатного для визначення відсотка ідентичності послідовності і подібності послідовності, можна навести BLAST алгоритм, який описано в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990). Програмне забезпечення для виконання BLAST- аналізу доступне широкому загалу через Національний Центр Біотехнологічної Інформації (NCBI) (доступна для загалу через Інтернет сервер Національних Інститутів здоров'я NCBI). Здебільшого, для вирівнювання послідовностей можуть бути використані програмні параметри, встановлені виробником програм, хоча також можуть бути використані параметри, задані користувачем.

Для амінокислотних послідовностей, програма BLASTP використовує "по умовчання" довжину слова (W) з 3, очікування (E) з 10, і BLOSUM62-матрицю кількісної оцінки (див. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Переважаю, положення залишків, які не ідентичні, відрізняється консервативними замінами амінокислот. З метою класифікації амінокислотних заміни, як консервативних, так і неконсервативних, амінокислоти групуються наступним чином: Група I (з гідрофобними бічними ланцюгами): лейцин, метіонін, аланін, валін, лейцин, ізолейцин; Група II (з нейтральними гідрофільними бічними ланцюгами) цистеїн, серин, треонін; Група III (з кислими бічними ланцюгами): аспарагін, глутамін; Група IV (з основними бічними ланцюгами): аспарагін, глутамін, гістидин, лізин, аргінін; Група V (залишки, які впливають на розташування ланцюга): гліцин, пролін; і Група VI (ароматичні бічні ланцюги): триптофан, тирозин, фенілаланін. Консервативні заміни включають заміни між амінокислотами одного класу. Неконсервативні заміни полягають в заміні члена одного класу представником іншого класу.

Переважаю, гуманізовані імуноглобуліни або антитіла зв'язують антиген з афінністю, яка в 3,4 або п'ять разів більша, ніж у відповідного негуманізованого антитіла. Наприклад, якщо негуманізоване антитіло має зв'язуючу афінність 10^9 M^{-1} , гуманізовані антитіла будуть мати зв'язуючу афінність, принаймні, $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ або 10^{10} M^{-1} . Характеризуючи зв'язуючі властивості імуноглобуліну або ланцюга антитіла, ланцюг може бути описаний, виходячи з його здатності "спрямовувати зв'язування антигена (наприклад, Aβ)". Говорять, що ланцюг "спрямовує зв'язування антигена", якщо він надає інтактному імуноглобуліну або антитілу (або його антигензв'язуючому фрагменту) властивості до специфічного зв'язування або зв'язуючої спорідненості. Вважають, що мутація (наприклад, зворотна мутація) істотно впливає на здатність важкого або легкого ланцюга спрямовувати зв'язування антигена, якщо вона впливає (наприклад, зменшує) зв'язуючу спорідненість інтактного імуноглобуліну або антитіла (або його антигензв'язуючого фрагмента), який містить вказаний ланцюг, принаймні, на порядок, у порівнянні з антитілом (або його антигензв'язуючим фрагментом), яке представляє ідентичний ланцюг, в якому відсутня зазначена мутація. Мутація "істотно не впливає (наприклад, зменшує) на здатність ланцюга спрямовувати зв'язування антигена", якщо вона впливає

(наприклад, зменшує) зв'язуючу спорідненість інтактного імуноглобуліну або антитіла (або його антигензв'язуючого фрагмента), який включає зазначений ланцюг, лише в два, три, чотири рази у порівнянні з антитілом (або його антигензв'язуючим фрагментом), який включає ідентичний ланцюг, що не містить такої мутації.

Термін "химерний імуноглобулін" або антитіло стосується імуноглобуліну або антитіла, варіабельні області якого походять від одного виду, а константні області походять від іншого виду. Химерні імуноглобуліни або антитіла можуть бути сконструйовані, наприклад, з використанням методів генетичної інженерії, з використанням сегментів гену імуноглобуліну, що належать різним видам. Введенням терміну "гуманізований імуноглобулін" або "гуманізоване антитіло" не мали наміру охопити ним химерні імуноглобуліни або антитіла, як визначено *infra*. Хоча гуманізовані імуноглобуліни або антитіла за своєю конструкцією є химерними (гібридними) (наприклад, включають ділянки білків більше, що належать різним видам), їм також притаманні додаткові властивості (наприклад, варіабельні області, які містять залишки донорних CDR і залишки каркасної частини акцептора), не виявлені у химерних імуноглобулінів або антитіл, як визначено тут.

"Антиген" - це об'єкт (наприклад, білковий об'єкт або поліпептид), з яким антитіло специфічно зв'язується.

Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" стосується місця на антигені, в якому імуноглобулін або антитіло (або його антигензв'язуючий фрагмент) специфічно зв'язується. Епітопи можуть бути утворені як сусідніми амінокислотами, так і несусідніми амінокислотами, накладання яких забезпечується третинною структурою білку. Епітопи, утворені сусідніми амінокислотами, як правило, стійкі до дії денатуруючих розчинів, тоді як епітопи, утворені внаслідок складчастості третинної структури білку, втрачаються після обробки денатуруючими розчинами. Епітопи здебільшого включають, щонайменше, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот, які мають унікальну просторову структуру. Методи визначення просторової структури включають, наприклад, рентгенокристалографію і двохи́мрний ядерний магнітний резонанс. Див., наприклад, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol.66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Антитіла, які розпізнають один і той же епітоп, можуть бути ідентифіковані за допомогою простого методу імуного аналізу, який показує здатність одного антитіла блокувати зв'язування іншого антитіла з антигеном-мішенню, наприклад, за допомогою конкурентно-зв'язуючого аналізу. Конкурентне зв'язування визначається за допомогою тесту, в якому досліджуваний імуноглобулін виявляє специфічне зв'язування еталонного антитіла із звичайним антигеном, таким як Аβ. Відомо багато способів конкурентно-зв'язуючого аналізу, наприклад: твердофазний прямий або непрямий імунорадіометричний аналіз (RIA), твердофазний прямий або непрямий імуноферментний аналіз (EIA), аналіз конкурентного імуносендвічу (див. Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9: 242 (1983)); твердофазний прямий біотин-авідин імуноферментний аналіз EIA (див. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137: 3614 (1986)); твердофазний прямий аналіз з використанням міток, твердофазний прямий аналіз з використанням міченого імуносендвічу (див. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазний прямий імунорадіометричний аналіз (RIA) з використанням 1-125 мітки (див. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1): 7 (1988)); твердофазного прямого біотин-авідин EIA (Cheung et al., *Virology* 176: 546 (1990)); і прямого RIA з використанням міток. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)). Як правило, такі дослідження, передбачають використання очищеного антигена, зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами, які несуть один з цих імуноглобулінів: немічений досліджуваний імуноглобулін і мічений еталонний (референт) імуноглобулін. Конкурентне гальмування вимірюється шляхом визначення кількості мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або клітинами в присутності досліджуваного імуноглобуліну. Як правило, досліджуваний імуноглобулін присутній в надлишку. Як правило, якщо конкуруюче антитіло присутнє в надлишку, воно буде гальмувати специфічне зв'язування еталонного антитіла із маркерним антигеном, принаймні на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% чи більше.

Епітоп також розпізнається імунокомпетентними клітинами, наприклад, В-лімфоцитами і/або Т-лімфоцитами. Клітинне імунологічне розпізнавання епітопа може бути визначене за допомогою аналізу *in vitro*, який оцінює антиген-залежну проліферацію, що визначається шляхом включення ³H-тимідину, секрецією цитокиніну, секрецією антитіла чи антиген-залежного кіллінгу [цитолізу] (аналіз цитотоксичності Т-лімфоцитів).

Типові епітопи або антигенні детермінанти можуть бути виявлені в попереднику амілоїдного білка людини (APP), але переважно вони знаходяться в Аβ пептиді APP. Існують численні ізоформи APP, наприклад, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ і APP⁷⁷⁰. Амінокислотам в межах APP задані номери відповідно до послідовності APP⁷⁷⁰ ізоформи (див., наприклад, GenBank Accession No.P05067). Аβ (який тут також названий як бета амілоїдний пептид і А-бета) пептид є внутрішній фрагмент APP, з молекулярною масою, приблизно, 4-kDa, утворений 39-43 амінокислотами APP (Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 і Aβ43). Aβ40, наприклад, складається з 672-711 залишків APP і Aβ42 складається з 673-713 залишків APP. Внаслідок протеолітичного процесингу APP різними секретазними ферментами *in vivo* або *in situ*, Аβ виявляється як в "короткій формі", 40 амінокислот завдовжки, так і в "довгій формі", яка утворена 42-43 амінокислотами. Бажані епітопи або антигенні детермінанти, як тут описано, розміщені на N-кінцевій ділянці Аβ-пептиду і включають залишки 1-10 амінокислот Аβ, переважно від 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 до 3-7 залишків Аβ42. Крім названих, епітопи або антигенні детермінанти включають 2-4, 5, 6, 7 або 8 залишків Аβ, 3-5, 6, 7, 8 або 9 залишків Аβ, або 4-7, 8, 9 або 10 залишків Аβ42. Коли говорять, що антитіло зв'язується з епітопом в межах точно визначених залишків, таких як Аβ 3-7, це означає, що антитіло специфічно зв'язується з поліпептидом, який включає точно визначені залишки (наприклад, Аβ 3-7 в цьому прикладі). Таке антитіло не обов'язково контактує з кожним 3-7 залишком Аβ. Заміна кожної окремої амінокислоти або делеція в межах Аβ 3-7 теж не обов'язково істотно впливає на зв'язуючу спорідненість. Термін "амілоїдний генна хвороба" включає будь-яке заворування, пов'язане (чи зумовлене) утворенням або відкладенням нерозчинних амілоїдних фібрил. У типовому випадку амілоїдогенне захворювання включає, але не обмежене ними, системний амілоїдоз, хворобу Альцгеймера, дорослу форму діабету, хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона, фронто-темпоральну деменцію, пріонові інфекційні спонгіозні енцефалопатії (куру і хворобу Крейтцфельда-Якоба у людей, свербєць і BSE у овець і великої рогатої худоби, відповідно). Різні амілоїдогенні захворювання визначаються або характеризуються природою поліпептидної речовини, яка відкладається в нейрофібрилах. Наприклад, у суб'єктів або пацієнтів, які потерпають від хвороби

Альцгеймера, β -амілоїдний білок (наприклад, природний тип, варіант, або процесований β -амілоїдний білок) є характерним поліпептидним компонентом амілоїдних відкладень. Відповідно, хвороба Альцгеймера є прикладом "захворювання, яке характеризується відкладеннями А β " або "захворювання, пов'язаного з відкладеннями А β ", наприклад, в мозку суб'єкта або пацієнта Термін " β -амілоїдний білок", " β -амілоїдний пептид", " β -амілоїдний", "А β " і "А β -пептид" використовуються тут поперемінно.

"Імуногенний агент" або "імуноген" здатний індукувати імунну реакцію проти себе на введення ссавцям, не обов'язково у поєднанні з ад'ювантом.

Термін "лікування", як тут використовується, визначається як застосування або введення терапевтичного засобу пацієнту, або застосування чи введення терапевтичного засобу в ізолювану тканину або клітинну лінію, отриману від пацієнта, який має хворобу, симптоми хвороби або схильність до хвороби, з метою лікувати, полегшувати страждання, надавати допомогу, вилікувати, покращувати стан або впливати на хворобу, симптоми хвороби або схильність до хвороби.

Термін "ефективна доза" або "ефективне дозування" визначається як кількість препарату, достатня для того, щоб досягти, принаймні, частково, бажаного ефекту. Термін "терапевтично ефективна доза" визначається як кількість препарату, достатня для того, щоб лікувати або, принаймні, блокувати хворобу і її ускладнення у пацієнта, який вже потерпає від хвороби. Кількість препарату, ефективна для такого використання, залежить від серйозності захворювання та загального стану імунної системи пацієнта. Термін "пацієнт" включає людину та інших ссавців, які отримують препарат з профілактичною або лікувальною метою.

"Розчинний" або "дисоційований" А β стосується неагрегованого або розщепленого А β -поліпептиду, включаючи мономерний розчинний, а також олігомерний розчинний А β -поліпептид (наприклад, розчинні А β димери, тримери тощо). "Нерозчинний" А β стосується агрегованого А β -поліпептиду, наприклад, А β , який утримується нековалентними зв'язками. Вважають, що А β (наприклад, А β 42) агрегується, принаймні, частково, завдяки наявності гідрофобних залишків в С-кінцевій ділянці пептиду (частина трансмембранного домену APP). Розчинний А β може бути виявлений *in vivo* в біологічних рідинах, таких як цереброспінальна рідина і/або сироватка. В якості альтернативи, розчинний А β можна приготувати, розчиняючи ліофілізований пептид в бичачій сироватці DMSO за допомогою ультразвуку. Розчин, який отримують внаслідок цього, центрифугують (наприклад, при 14,000хg, 4°C, 10 хвилин), для того щоб видалити будь-які нерозчинні частки.

Термін "ефекторна функція" стосується активності залишків Fc-області антитіла (наприклад, IgG антитіла) і включає, наприклад, здатність антитіла зв'язувати ефекторні молекули, такі як комплемент і/або Fc рецептори, які можуть контролювати кілька імунних функцій антитіла, таких як активність ефекторних клітин, лізис, комплемент-опосередкована активність, кліренс антитіла, і час напіврозпаду антитіла.

Термін "ефекторна молекула" стосується молекули, яка здатна зв'язуватись з Fc-областю антитіла (наприклад, IgG антитіла), включаючи, але не обмежена, з білком комплемента або Fc рецептором.

Термін "ефекторна клітина" стосується клітин, здатних зв'язуватись з Fc частиною антитіла (наприклад, IgG антитіла), у типовому випадку *via* Fc рецептор, експресований на поверхню ефекторних клітин, включаючи, але не обмежена, лімфоцити, наприклад, антигенпредставляючі клітини і Т-лімфоцити.

Термін "Fc область" стосується С-кінцевої ділянки IgG антитіла, зокрема, С-кінцевої ділянки важкого ланцюга(гів) зазначеного антитіла. Хоча межі Fc- області важкого ланцюга IgG можуть дещо варіювати, Fc-область типово визначається як відстань від амінокислотного залишка Cys226 до карбоксикінцевої ділянки важкого ланцюга(гів) IgG.

Термін "Kabat-нумерація", за виключенням тих випадків, коли прийнята інша нумерація, визначається як нумерація залишків в, наприклад, важкому ланцюзі IgG антитіла використовуючи EU індекс, як це описано у Kabat et al., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), спеціально включена тут як довідкова інформація.

Термін Tc рецептор" або "FcR" стосується рецептора, який зв'язується з Fc-областю антитіла. Типові Fc рецептори, які зв'язуються з Fc-областю антитіла (наприклад, IgG антитіла) включають, але не обмежені цим, рецептори Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII підкласів, включаючи алельні варіанти і альтернативно сплайсовані форми цих рецепторів. Fc рецептори критично розглянуто в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); and de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995).

I. Імунологічні і терапевтичні реактиви

Імунологічні і терапевтичні реактиви винаходу включають або складаються з імуногенів або антитіл, або функціонального чи антигенного зв'язування їх фрагментів, як тут визначено. Відомо, що основною структурною одиницею антитіла є тетрамер, утворений субодиницями. Кожен тетрамер утворений двома ідентичними парами поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара має один легкий (біля 25kDa) і один важкий (біля 50-70kDa) ланцюг. Аміно-термінальна частина кожного ланцюга включає варіабельну область, яка складається з 100-110 і більше амінокислот, в основному відповідальних за зв'язування антигена. Карбокситермінальна частина кожного ланцюга визначає константну область, відповідальну в основному за ефекторну функцію.

Легкі ланцюги класифікуються як каппа або лямбда і складаються з приблизно 230 залишків у довжину. Важкі ланцюги класифікуються як гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ), або епсилон (ϵ), і складаються приблизно з 450-500 залишків у довжину, і визначають ізоформи антитіла IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, відповідно. Як важкі, так і легкі ланцюги упаковані в доменах. Термін "домен" стосується глобулярної ділянки білка, наприклад, імуноглобуліну або антитіла. Імуноглобулін або домени антитіла включають, наприклад, 3 або 4 пептидних петлі, стабілізовані β -складчастою структурою і міжланцюговими дисульфідними зв'язками. Інтактні легкі ланцюги мають, наприклад, два домени (V_L і C_L), інтактні важкі ланцюги мають, наприклад, чотири або п'ять доменів (V_H, C_{H1}, C_{H2} і C_{H3}).

Всередині легкого і важкого ланцюгів, варіабельні і константні ділянки об'єднані "J"-ділянкою, яка складається з 12 або більше амінокислот, важкий ланцюг також включає "D"-ділянку, яка складається з 10 і більше амінокислот (Див. Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989), Ch. 7, включена у повному обсязі як довідкова інформація для будь-яких потреб).

Варіабельна область кожної пари ланцюгів (важкий/легкий) утворює антитіло-зв'язуючий сайт. Таким чином, інтактне антитіло має 2 зв'язуючих центри. За винятком гетеровалентних або біспецифічних антитіл, два зв'язуючих центри однакові. Всі ланцюги виявляють однакову загальну структуру відносно консервативних каркасних ділянок (FR), до складу яких входять 3 гіперваріабельні ділянки, які ще називають ділянками, що визначають комплементарність до антигена, або CDR-ділянками.

Природні ланцюги або рекомбінантні ланцюги можуть бути експресовані з лінійною послідовністю, яка зміщується протягом клітинного процесингу до утворення зрілого ланцюга. Зрілий ланцюг може також мати рекомбінантне походження і мати неприродну лінійну послідовність, наприклад, яка може підсилювати секрецію або змінювати процесинг окремих ланцюгів, що становлять певний інтерес.

CDR-ділянки двох зрілих ланцюгів кожної пари приєднані до каркасних ділянок, що робить неможливим зв'язування із специфічним епітопом. Від N-кінцевого до C-кінцевого як легкий, так і важкий ланцюги, включають домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. "FR4" називається також в імунології як D/J ділянка варіабельного важкого ланцюга і J ділянка варіабельного легкого ланцюга. Розподіл амінокислот у кожному домені відбувається відповідно до визначення Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991). Альтернативне структурне визначення було запропоноване Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Nature 342:878 (1989); and J. Mol. Biol. 186: 651 (1989) (в подальшому це джерело називається колективно як "Chothia et al" і включено у повному обсязі для використання з будь-якою метою як довідкова інформація).

A. Aβ Антитіла

Терапевтичні препарати винаходу включають антитіла, які специфічно зв'язуються з Aβ або іншими компонентами амілоїдних бляшок. Перевагу надають антитілам, які є моноклональними антитілами. Деякі з цих антитіл специфічно зв'язуються з агрегованою формою Aβ, не зв'язуючи при цьому розчинну форму. Деякі антитіла специфічно зв'язують розчинну форму, не зв'язуючись з агрегованою формою. Деякі антитіла зв'язуються як з агрегованою, так і розчинною формами. Антитіла, які використовуються в терапевтичних методах, переважно мають інтактну константну область або, принаймні, достатню, для того щоб взаємодіяти з Fc-рецептором. Перевага надається антитілам, ефективним при стимуляції Fc-опосередкованого фагоцитозу Aβ в бляшках. Перевага віддається ізотипу IgG1 людини, тому що він має найвищу афінність ізотипів людини до FcR1 рецептора на фагоцитах (наприклад, на гістіоцитах мозку або мікрогліальних клітинах). IgG1 людини еквівалентний мишачому IgG2a, тобто останній з двох вищезгаданих є придатним для вивчення *in vivo* ефективності на тваринних (наприклад, мишачих) моделях хвороби Альцгеймера.

Фрагмент біспецифічного Fab також може бути використаний, у якого одне плече (слейсерна група) має специфічність до Aβ, а інше - до Fc рецептора. Бажані антитіла зв'язуються з Aβ із афінністю, більшою ніж (або рівною) приблизно $10^6, 10^7, 10^8, 10^9$, або 10^{10} M^{-1} (включаючи проміжні значення афінності).

Моноклональні антитіла зв'язуються із специфічним епітопом в Aβ, який може бути конформативним або неконформативним епітопом. Профілактична і терапевтична ефективність антитіл може бути досліджена за допомогою методик трансгенної тваринної моделі, описаних в Прикладах. Ті моноклональні антитіла, яким віддається перевага, зв'язуються з епітопом в межах 1-10 залишків Aβ (з першим N-кінцевим залишком природного Aβ, позначеним 1), більш бажано, зв'язується з епітопом в межах 3-7 залишків Aβ. В деяких методах використовуються множинні моноклональні антитіла, які мають зв'язуючу специфічність по відношенню до різних епітопів, наприклад, антитіло, специфічне до епітопу в межах залишків 3-7 Aβ, може бути введене одночасно з антитілом, специфічним до епітопу, який знаходиться поза 3-7 залишками Aβ. Такі антитіла можуть вводиться послідовно або одночасно. Також можуть бути використані антитіла до інших, ніж Aβ, амілоїдних компонентів (наприклад, призначені або одночасно призначені).

Специфічність епітопа антитіла може бути визначена, шляхом створення бібліотеки генів фага, в якій різні члени представляють різну підпослідовність Aβ. Бібліотека генів фага потім відбирається для членів, які специфічно зв'язуються з антитілом, яке досліджується. Ізолюється родина послідовностей. Здебільшого така родина включає звичайну капсидну послідовність, і варіюючі довжини фланківних послідовностей у різних членів.

Найкоротша послідовність, яка показує специфічне зв'язування антитіла, визначає межі епітопа антитіла. Антитіла можуть також бути досліджені за допомогою конкурентно-зв'язуючого аналізу на специфічність епітопа щодо антитіла, епітопи якого вже визначені. Наприклад, антитіла, які конкурують з 12B4 антитілами за зв'язування з Aβ, зв'язуються з тим же самим або подібним епітопом, що й 12B4, наприклад, тим, що розташований в межах 3-7 залишку Aβ. Серологічне тестування на специфічність зв'язування епітопа є корисною передумовою визначення терапевтичної ефективності. Наприклад, антитіло, яке зв'язується з епітопом в межах 1-7 залишків Aβ, ймовірно, буде ефективним при профілактиці і лікуванні хвороби Альцгеймера відповідно до методології даного винаходу.

Антитіла, які специфічно зв'язують певний сегмент Aβ без зв'язування з іншими ділянками Aβ, мають низку переваг у порівнянні з моноклональними антитілами, які зв'язуються з іншими ділянками, або поліклональними сироватками до інтактного Aβ. Перш за все, при однаковому масовому дозуванні, доза антитіл, які специфічно зв'язуються з певними сегментами, містить молярну частку антитіл, ефективних при виведенні амілоїдних бляшок По-друге, антитіла, які специфічно зв'язуються з певними сегментами, можуть індукувати "очищуючу" відповідь проти амілоїдних відкладень, не індукуючи при цьому "очищуючу" відповідь проти інтактного APP поліпептиду, зменшуючи у такий спосіб можливі побічні ефекти.

1. Утворення антитіл, які не належать людині

Даний винахід представляє антитіла, які не належать людині, наприклад, антитіла, які специфічні стосовно певних Aβ епітопів винаходу. Такі антитіла можуть бути використані при складанні різних терапевтичних композицій винаходу або, переважно, забезпечити гіперваріабельні ділянки для утворення гуманізованих або химерних антитіл (докладно описані нижче). Виробництво моноклональних антитіл, що не належать людині, наприклад, антитіл мишей, морських свинок, приматів, кроликів або щурів, може супроводжуватись, наприклад, імунізацією тварин Aβ. Довший поліпептид, який включає Aβ або імуногенний фрагмент Aβ або

антитіла, антиідіотипічного до антитіла до Аβ, також можуть бути використані. Див. Harlow & Lane, *supra*, включений як довідкова інформація для будь-яких цілей). Такий імуноген може бути отриманий з природного джерела шляхом синтезу поліпептиду або рекомбінантної експресії. Імуноген необов'язково має застосовуватись у поєднанні з білком-носієм, як описано нижче. Імуноген необов'язково має застосовуватись разом з ад'ювантом. Термін "ад'ювант" стосується сполуки, яка при застосуванні у поєднанні з антигеном підсилює імунну відповідь по відношенню до антигена, а при введенні поодиноці не викликає імунної відповіді до антигена. Ад'юванти можуть підсилювати імунну відповідь за рахунок кількох механізмів, включаючи такі як рекрутмент лімфоцитів, стимуляція В і/або Т клітин, стимуляція макрофагів. Можуть бути використані кілька типів ад'ювантів, як описано нижче. При імунізації лабораторних тварин бажано віддавати перевагу повному ад'юванту Фрейнда, за яким використовується неповний ад'ювант. Кролі або морські свинки здебільшого використовуються для отримання поліклональних антитіл. Типове приготування поліклональних антитіл, наприклад, для пасивного захисту, може бути виконане таким чином. 125 нетрансгенних мишей імунізуються введенням 100мг Аβ1-42, з використанням CFA/IFA ад'юванту, після чого через 4-5 місяців їх безболісно умертвляли. Кров імунізованих мишей збирали. IgG відокремлювали від інших компонентів крові. Антитіла, специфічні до імуногену, можуть частково бути очищені методом афінної хроматографії. Від однієї миші отримують в середньому 0.5-1мг імуноген-специфічних антитіл, внаслідок чого загальний вихід становить 60-120мг.

Для отримання моноклональних антитіл здебільшого використовуються миші. Моноклональні антитіла можуть бути отримані проти окремого фрагмента, шляхом введення мишам фрагмента або довшої форми Аβ, за рахунок отримання гібридом і тестування гібридом на антитіло, яке специфічно зв'язує Аβ. На вибір, антитіла тестуються на зв'язування з специфічною ділянкою або певним фрагментом Аβ без зв'язування з іншими фрагментами Аβ, які не перекриваються. Цей скринінг може бути здійснений шляхом визначення зв'язування антитіла з набором делеційних мутантів Аβ пептиду і з'ясовуючи, які делеційні мутанти зв'язуються з антитілом. Величина зв'язування може бути оцінена, наприклад, за допомогою методу імуноферментного налізу ELISA або вестерн-блоту. Найменший фрагмент, який виявляє специфічне зв'язування з антитілом, визначає епітоп антитіла. Альтернативно, специфічність епітопа може бути визначена за допомогою методу конкурентного аналізу, в якому тест-антитіло і еталонне (референс-антитіло) конкурують за зв'язування Аβ. Якщо тестові і еталонні антитіла конкурують, тоді вони зв'язуються з тим самим епітопом, або достатньо близькими епітопами, так що зв'язування одного антитіла накладається на зв'язування іншого. Бажаним ізотипом для таких антитіл є мишачий ізотип IgG2a або рівноцінний ізотип іншого виду. Ізотип IgG2a миші рівноцінний ізотипу IgG1 людини (наприклад, IgG1 людини).

2. Химерні або гуманізовані антитіла

Даний винахід також представляє химерні і/або гуманізовані антитіла (наприклад, химерні і/або гуманізовані імуноглобуліни), специфічні до бета амілоїдного пептиду. Химерні і/або гуманізовані антитіла мають однакову або подібну зв'язуючу специфічність і афінність як і мишаче або інше антитіло, що не належить людині, і є стартовим матеріалом для конструювання химерного або гуманізованого антитіла.

А. Отримання химерних антитіл

Термін "химерне антитіло" стосується антитіла, гени легкого і важкого ланцюгів якого сконструйовані, здебільшого з використанням методів генної інженерії, з сегментів гена імуноглобуліну, які належать різним видам. Наприклад, варіабельні (V) сегменти генів мишачого моноклонального антитіла можуть бути поєднані константними (C) сегментами генів антитіл людини, таких як IgG1 і IgG4. Перевага надається ізотипу IgG1 людини. Таким чином, типове химерне антитіло є гібридним білком, який складається з V- або антигензв'язуючого домену з мишачого антитіла і C- або ефекторного домена антитіла людини.

В. Отримання гуманізованих антитіл

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіла, яке включає, принаймні, один ланцюг, який містить каркасні залишки варіабельної області, головним чином, з ланцюга антитіла людини (названого як акцепторний імуноглобулін або антитіло) і, принаймні, одну ділянку, яка визначає комплементарність, головним чином, з мишачого антитіла (названого як донорний імуноглобулін або антитіло). Див., Queen et al., 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, Seltick et al., WO 90/07861, and Winter, US 5,225,539 (включено як довідкова інформація для використання у повному обсязі з будь-якою метою). Константна область (i), якщо вона присутня, також, значною мірою або повністю походить з імуноглобуліну людини.

Заміна каркасної частини варіабельного домену людини мишачими CDR, найбільш ймовірно призведе до збереження їх просторової орієнтації, якщо каркасна частина варіабельного домену людини набуде тієї ж самої або подібної конформації, як варіабельна каркасна частина антитіла миші, з якої походять CDR-ділянки. Цього можна досягти за рахунок отримання варіабельних доменів людини з антитіл людини, послідовність каркасної ділянки яких виявляє високу ступінь ідентичності з послідовністю варіабельного домену каркасної частини мишачих антитіл, звідки було взято CDR-ділянки. Каркасна частина варіабельних областей важкого і легкого ланцюга може походити з тієї ж самої або іншої послідовності антитіла людини. Можуть бути використані природні послідовності антитіла людини, або може бути використаний набір послідовностей з різних антитіл людини. Див. Kettleborough et al., Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6: 971 (1993) and Carter et al., WO 92/22653.

При наявності ідентифікованих ділянок, що визначають комплементарність, донорного мишачого імуноглобуліну і відповідного акцепторного імуноглобуліну людини, наступним кроком має бути визначення того, який з цих компонентів, якщо це взагалі можливо, повинен бути замінений, для того щоб оптимізувати властивості гуманізованого антитіла, яке буде отримано. Загалом, кількість замін амінокислотних залишків людини мишачими має бути зведена до мінімуму, тому що введення мишачих залишків збільшує ризик утворення антитіл, які будуть викликати у людини імунну відповідь проти мишачих антитіл (НАМА). Для того, щоб стежити за можливістю виникнення НАМА-реакції, у окремого пацієнта або протягом клінічних випробувань можуть бути застосовані загальноприйняті в імунології методи вивчення імунної відповіді. У

пацієнтів, щодо яких були застосовані гуманізовані антитіла, імуногенність може бути визначена на початку введення препарату, а також протягом застосування вказаного виду терапії. НАМА-реакція вимірюється, наприклад, визначенням антитіл до гуманізованого терапевтичного препарату в зразках сироватки, взятих у пацієнта, за допомогою загальноприйнятих методів, включаючи технологію поверхневого резонансу плазмону (BIACORE) і/або твердофазного імуоферментного аналізу ELISA.

Певні амінокислоти серед каркасних залишків варіабельної області відбираються для заміни, виходячи з їхньої потенційної здатності впливати на конформацію CDR і/або зв'язування антигена. Неприродне накладання CDR ділянок миші на каркасну ділянку варіабельної області антитіла людини може призвести до певних структурних обмежень, які, якщо не буде здійснена заміна певних амінокислотних залишків, може призвести до втрати зв'язуючої спорідненості.

Відбір амінокислотних залишків для заміни визначається, частково, за допомогою комп'ютерного моделювання. Комп'ютерне технічне і програмне забезпечення описується тут для отримання тримірного зображення молекул імуноглобуліну. Загалом, створення моделей молекули розпочинається з використання розшифрованої структури для ланцюгів імуноглобуліну або їх доменів. Для того щоб змодельовати ланцюги, порівнюється амінокислотна послідовність цих ланцюгів з амінокислотою послідовністю ланцюгів або доменів, тримірна структура яких вже розшифрована, ланцюги або домени, які виявляють найвищий ступінь подібності послідовностей, є відправною точкою при побудові моделі молекули. Для моделювання відбираються ланцюги або домени, ідентичність послідовностей яких становить, принаймні, 50%, бажаніше ті, ідентичність послідовностей між якими становить, принаймні, 60%, 70%, 80%, 90% і більше. Стартова структура молекули модифікується, що дає змогу змодельовати відмінності між положенням дійсних амінокислот в ланцюгах чи доменах імуноглобуліну і положенням цих амінокислот в стартовій моделі. Модифіковані структури потім "вмонтовуються" в складний імуноглобулін. Врешті решт модель доопрацьовується з точки зору мінімізації енергії і перевірки, що всі атоми знаходяться в межах прийнятних відстаней один від одного, і що довжина зв'язків і кутів знаходяться в межах, допустимих з точки зору хімії.

Відбір амінокислотних залишків для заміни може також бути визначений, частково, за рахунок вивчення особливостей амінокислот, що перебувають в певному місцеположенні, або емпіричного спостереження за впливом замін чи мутагенезу певних амінокислот. Наприклад, якщо відрізняється амінокислота в мишачому залишку каркасу варіабельної області і відібраний залишок каркасної ділянки варіабельної області людини, амінокислота в каркасній частині імуноглобуліну людини має бути, як правило, замінена рівноцінною амінокислотою каркасної області антитіла миші, якщо ця кислота задовольняє таким вимогам:

(1) нековалентно прямо зв'язує антиген,

(2) прилягає до CDR ділянки,

(3) іншим чином взаємодіє з CDR ділянкою (наприклад, знаходиться в межах приблизно 3-6Å від CDR ділянки, як було визначено за допомогою комп'ютерного моделювання), або (4) бере участь в утворенні поверхні контакту VL-VH.

Залишки, які "нековалентно прямо зв'язують антиген", включають амінокислоти каркасних областей, для яких існує висока ймовірність прямої взаємодії з амінокислотами антигена за рахунок виникнення сил хімічного зв'язку, наприклад, водневого зв'язку або сил Ван дер Ваальса, гідрофобної взаємодії тощо.

CDR-ділянки і каркасні ділянки визначаються у відповідності до Kabat et al, або Chothia et al., supra. Якщо залишки каркасної частини, як визначено Kabat et al., supra, утворюють залишки структурних петель, як визначено Chothia et al., supra, амінокислоти антитіла миші можуть бути відібрані для заміни в гуманізованому антитілі. Залишки, які "прилегли до CDR-ділянки", включають амінокислотні залишки, що перебувають в положенні, безпосередньо прилеглому до однієї або кількох CDR-ділянок в первинній послідовності ланцюга гуманізованого імуноглобуліну, наприклад, в положенні, безпосередньо прилеглому до CDR-ділянки, як визначено Kabat, або CDR-ділянки, як визначено Chothia (Див., наприклад, Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987)). Ці амінокислоти особливо ймовірно взаємодіють з амінокислотами в CDR-ділянках і, якщо їх обирають з акцепторного імуноглобуліну, спотворюють донорні CDR-ділянки і зменшують афінність. Крім того, прилеглі амінокислоти можуть взаємодіяти безпосередньо з антигеном (Amit et al., Science, 233: 747 (1986), включено тут як довідкова інформація) і, відбираючи ці амінокислоти у донора, може бути бажано, для того щоб утримувати всі зв'язки антигена, які забезпечують афінність у вихідному антитілі.

Залишки, що "іншим чином взаємодіють з CDR-ділянкою" включають ті залишки, що, як визначено за допомогою аналізу вторинної структури, перебувають в просторовій орієнтації, яка дозволяє їм впливати на CDR-ділянку. В одному втіленні, залишки, які "іншим чином взаємодіють з CDR-ділянкою", ідентифікуються за допомогою аналізу тримірної моделі донорного імуноглобуліну (наприклад, комп'ютерної моделі). Тримірна модель, у типовому випадку вихідного донорного антитіла, показує, що певні амінокислоти, які знаходяться поза CDR-ділянками, однак розташовані поряд з ними, внаслідок чого існує велика ймовірність взаємодій цих амінокислот з амінокислотами CDR-ділянок за рахунок виникнення водневого зв'язку, сил Ван дер Ваальса, гідрофобної взаємодії, і т.п. У цьому відношенні, амінокислоти донорного імуноглобуліну, а не амінокислоти акцепторного імуноглобуліну, можуть бути відібрані. Щоб відповідати цьому критерію, амінокислоти повинні мати атом бічного ланцюга, розташований на відстані приблизно 3Å від деяких атомів CDR-ділянок і повинен включати атом, який міг би взаємодіяти з атомами CDR-ділянки внаслідок виникнення хімічних сил, які були перелічені вище.

У випадку атомів, які можуть утворювати водневий зв'язок, відстань 3Å вимірюється між їх ядрами, тоді як для атомів, що не утворюють водневого зв'язку, 3Å - це відстань між поверхнями сил Ван дер Ваальса. Тому, в останньому випадку, ядра мають бути розташованими на відстані приблизно 6Å (3Å плюс сума радіусів сили Ван дер Ваальса), для того щоб атоми могли взаємодіяти. У багатьох випадках відстань між ядрами становить від 4 чи 5 до 6Å. При визначенні того, чи може амінокислота взаємодіяти з CDR-ділянками, бажано не розглядати останніх 8 амінокислот CDR2 важкого ланцюга, як частини CDR-ділянок, тому що з точки зору структури ці 8 амінокислот поведуть себе більше як частина каркасної області.

Амінокислоти, які здатні взаємодіяти з амінокислотами CDR-ділянок, можуть бути ідентифіковані у дещо

інший спосіб Площа поверхні, досяжна для розчинника, кожної амінокислоти каркасу, підраховується двома способами: (1) в інтактному антитілі, і (2) в гіпотетичній молекулі, яка включає антитіло, CDR-ділянки якого видалені. Істотна відмінність між цими значеннями, що становить біля 10 квадратних ангстрем або більше, свідчить, що доступ амінокислоти каркасної частини до розчинника, принаймні, частково, блокується CDR-ділянками, і, відповідно, та амінокислота вступає в контакт з CDR-ділянками. Площа поверхні амінокислоти, досяжна для розчинника, може бути вирахована, базуючись на тримірній моделі антитіла, використовуючи загальновідомі в імунології алгоритми (наприклад, Connolly, J. Appl. Cryst. 16: 548 (1983) and Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55: 379 (1971), обидва джерела включені тут як довідкова інформація). Амінокислоти каркасу також можуть інколи взаємодіяти з CDR-ділянками опосередковано, впливаючи на конформацію каркасу іншої амінокислоти, яка, в свою чергу, контактує з CDR-ділянками.

Відомо, що амінокислоти в кількох положеннях в каркасній частині здатні до взаємодії з CDR-ділянками багатьох антитіл (Chothia and Lesk, supra, Chothia et al., supra and Tramontane et al., J. Mol. Biol. 215: 175 (1990), всі включені тут як довідкова інформація). Особливо це стосується амінокислот, що займають 2, 48, 64 і 71 позиції легкого ланцюга і 26-30, 71 і 94 позиції важкого ланцюга (нумерація за Kabat), які здатні взаємодіяти з CDR-ділянками багатьох інтитіл. Амінокислоти в позиціях 35 в легкому ланцюзі, і 93 і 103 в важкому ланцюзі, також, очевидно, взаємодіють з CDR-ділянками. Саме амінокислотам у всіх цих перелічених позиціях віддається перевага при виборі донорної амінокислоти, а не амінокислоти акцептора (якщо вони відрізняються) для використання у гуманізованому імуноглобуліні. З іншого боку, певні залишки, здатні взаємодіяти з CDR-ділянкою, такі як перші 5 амінокислот легкого ланцюга, також можуть бути взяті з акцепторного імуноглобуліну без втрати афінності гуманізованого імуноглобуліну.

Залишки, які "беруть участь в утворенні поверхні контакту VL-VH або "пакувальні залишки", включають ті залишки, які знаходяться на поверхні розділу між VL і VH, як визначено, наприклад, Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985) або Chothia et al., supra. В цілому, незвичайні пакувальні залишки повинні бути збережені в гуманізованому антитілі, якщо вони відрізняються від таких залишків в каркасній частині імуноглобуліну людини.

Загалом, одна або кілька амінокислот, які задовільняють вказаним вище критеріям, замінюються. В деяких втіленнях, замінюються всі або більшість амінокислот, які задовільняють вказаним вище критеріям. Інколи існує певна невизначеність щодо того, чи буде відповідати цим критеріям окрема амінокислота, і імуноглобуліни альтернативних варіантів будуть продукуватись, один з яких має цю заміну, а інший - ні.

Імуноглобуліни альтернативних варіантів, отримані таким чином, можуть бути досліджені з використанням будь-якого з методів імунологічного аналізу, описаних у цьому винаході, внаслідок чого потрібний імуноглобулін буде відібраний.

Як правило, CDR-ділянки гуманізованих антитіл значною мірою ідентичні, і, здебільшого, ідентичні відповідним CDR-ділянкам донорного антитіла. Інколи можливо здійснити заміну одного або кількох залишків консервативних амінокислот в CDR-ділянках без істотної зміни афінності гуманізованого імуноглобуліну, який отримується внаслідок цього, незважаючи на те, що це не завжди є бажаним. Під консервативними замінами мають на увазі такі поєднання, як гліцин, аланін; валін, ізолейцин, лейцин; аспарагінова кислота, глутамінова кислота; аспарагін, глутамін; серин, треонін; лізин, аргінін; а також фенілаланін, тирозин.

Додатковими кандидатами для заміни є амінокислоти каркасної частини рецептора людини, які є незвичайними або "рідкісними" для імуноглобуліну людини в цьому положенні. Ці амінокислоти можуть бути замінені амінокислотами, які займають аналогічне положення в донорному мишачому антитілі, або амінокислотами з аналогічних положень більш типових імуноглобулінів людини. Наприклад, заміна може вважатись бажаною, якщо амінокислота в каркасній області акцепторного імуноглобуліну людини є рідкісною для цього положення і відповідна амінокислота в донорному імуноглобуліні є звичайною для цього положення в послідовностях імуноглобуліну людини; або якщо амінокислота в акцепторному імуноглобуліні є рідкісною для цього положення і відповідна амінокислота в донорному імуноглобуліні також є рідкісною відносно інших послідовностей імуноглобуліну людини. Ці критерії допомагають впевнитись, що нетипова амінокислота в каркасній частині імуноглобуліну людини не дезінтегрує структуру антитіла. Крім того, внаслідок заміни нетипової акцепторної амінокислоти людини амінокислотою від донорного антитіла, яка може виявитись типовою для антитіл людини, гуманізоване антитіло може стати менш імуногенним.

Термін "рідкісний", як тут використовується, вказує на те, що амінокислота виявляється в цьому положенні менш, ніж приблизно в 20%, але, як правило, менше, ніж біля 10% послідовностей в репрезентативній вибірці послідовностей, а термін "поширена", як тут використовується, вказує, що амінокислота виявляється в більш, ніж 25%, але, як правило, більш, ніж біля 50% послідовностей в репрезентативній вибірці. Наприклад, всі послідовності варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів імуноглобуліну людини відповідно згруповані в "підгрупи" послідовностей, які особливо гомологічні одна одній і мають ті ж самі амінокислоти в певних критичних положеннях (Kabat et al., supra). При вирішенні питання, чи є амінокислота в акцепторній послідовності людини "рідкісною" чи "поширеною" серед послідовностей людини, часто бажано розглядати лише ті послідовності людини з тієї ж підгрупи, що й акцепторна послідовність.

Додатковими кандидатами для заміни є акцепторні амінокислоти каркасної частини імуноглобуліну людини, які були б ідентифіковані як частина CDR-ділянки відповідно до альтернативного визначення, запропонованого Chothia et al., supra. Додатковими кандидатами для заміни є амінокислоти каркасної частини імуноглобуліну людини, які були б ідентифіковані як частина CDR-ділянки відповідно до AbM і/або контактних визначень.

Додатковими кандидатами для заміни є залишки каркасної області акцептора, які відповідають рідкісним або нетиповим залишкам каркасної області донора. Рідкісні або нетипові залишки донорної каркасної області - це ті залишки, які є рідкісними або нетиповими (як тут визначено) в цьому положенні для мишачих антитіл. Для антитіл миші, підгрупа може бути визначена відповідно до Kabat і положення залишків визначається, яке відрізняється від консенсусної послідовності. Ці специфічні донорні відмінності можуть вказувати на соматичні мутації в мишачій послідовності, які підвищують активність. Нетипові залишки, які, відповідно до

прогнозування, здатні впливати на зв'язування, зберігаються, тоді як залишки, які, відповідно до прогнозування, не мають істотного впливу на зв'язування, можуть бути замінені.

Додатковими кандидатами для заміни є залишки негаметної лінії, які зустрічаються в каркаській області акцепторного антитіла. Наприклад, якщо ланцюг акцепторного антитіла (наприклад, ланцюг антитіла людини, який виявляє істотну гомологічність з послідовністю ланцюга донорного антитіла) порівнюється з ланцюгом гаметного антитіла (яке теж виявляє значну гомологічність ланцюгу донорного антитіла), залишки каркасної області акцепторного ланцюга, які не відповідають залишку каркасної області ланцюга гаметної лінії, можуть бути замінені відповідними залишками з гаметної послідовності.

На відміну від заміни специфічних амінокислот, які обговорювались вище, каркасні області гуманізованих антитіл, як правило, істотно ідентичні, і, більш того, ідентичні каркасним ділянкам антитіл людини, з яких вони походять. Звичайно, багато амінокислот в каркаській області не мають значного прямого впливу, або взагалі не впливають, на специфічність або афінність антитіла. Таким чином, багато окремих консервативних заміни залишків каркасної частини можуть бути дозволені без відчутного впливу на специфічність або афінність гуманізованого імуноглобуліну, отриманого внаслідок цього. Таким чином, в одному втіленні каркасна частина варіабельної області гуманізованого імуноглобуліну виявляє, принаймні, 85% гомологічності послідовності каркасної частини варіабельної області імуноглобуліну людини або співпадіння цих послідовностей. В іншому втіленні, каркасна частина варіабельної області гуманізованого імуноглобуліну виявляє, принаймні, 90%, краще 95%, ще краще 96%, 97%, 98% або 99% гомологічності послідовності каркасу варіабельної області імуноглобуліну людини або співпадіння цих послідовностей. Однак, загалом, такі заміни небажані.

Гуманізовані антитіла переважно виявляють специфічну афінність, принаймні, 10^7 , 10^8 , 10^9 або 10^{10}M^{-1} . Як правило, верхня межа афінності гуманізованих антитіл з антигеном в три, чотири або п'ять разів перевищує афінність донорного імуноглобуліну. Часто нижня межа афінності також в три, чотири або п'ять разів перевищує нижню межу афінності донорного імуноглобуліну. В альтернативному випадку, афінність може бути порівняна із зв'язуючою афінністю гуманізованого антитіла, в якому відсутні будь-які заміни (наприклад, антитіло, яке має донорні CDR-ділянки і акцепторні FR-ділянки, але жодних заміни в каркаській частині). В цьому випадку, зв'язування оптимізованого антитіла (яке включає заміни) переважно, принаймні, в два-три рази більше, або в три-чотири рази більше у порівнянні з антитілом, в якому немає заміни. Для того щоб робити порівняння, активність різних антитіл може бути визначена, наприклад, за допомогою BIACORE (наприклад, поверхневого резонансу плазмону з використанням немічених реактивів) або методу конкурентного зв'язування.

С. Виготовлення гуманізованих 12В4 Антитіл

Краще втілення даного винаходу представляє гуманізоване антитіло до N-кінцевої ділянки А β , зокрема, для використання в терапевтичних і/або діагностичних методах, описаних тут. Особливо бажаним стартовим матеріалом для виготовлення гуманізованих антитіл є 12В4. 12В4 є специфічним до N-кінцевої ділянки А β , який, як було показано, є проміжною ланкою фагоцитозу (наприклад, індукує фагоцитоз) амілоїдних бляшок. Клонування і секвенування кДНК, яка кодує варіабельні області важкого і легкого ланцюгів 12В4 антитіла, наводяться в Прикладі I.

Придатна послідовність акцепторного антитіла людини визначається за допомогою комп'ютерних порівнянь амінокислотних послідовностей варіабельних областей миші з послідовностями відомих антитіл людини. Порівняння здійснюється окремо для важкого і легкого ланцюгів, однак на основі принципів, подібних у кожному випадку. Зокрема, варіабельні домени антитіл людини, каркасна область яких виявляє високий ступінь ідентичності послідовності з VL і VH каркасними областями миші були визначені за допомогою бази даних Kabat з використанням програми NCBI BLAST (доступна для широкого загалу через Інтернет сервер Національних Інститутів Здоров'я NCBI) з відповідними послідовностями каркасної області миші. В одному втіленні, були відібрані акцепторні послідовності, які були гомологічними донорним послідовностям миші більш, ніж на 50%. Бажано віддати перевагу послідовностям акцепторного антитіла, які виявляють 60%, 70%, 80%, 90% або більше гомологічності.

Комп'ютерне порівняння 12В4 показало, що легкі ланцюги 12В4 виявляють найвищу ідентичність до легких ланцюгів людини підтипу каппа II, і що важкі ланцюги 12В4 виявляють найвищу ідентичність до важких ланцюгів людини підтипу II, як визначено Kabat et al., supra. Таким чином, бажано, щоб каркасні ділянки важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну людини були обрані серед антитіл людини цих підтипів, або були результатом поєднання послідовностей таких підтипів. Варіабельні області легкого ланцюга людини, які виявляють найвищу ідентичність послідовності до відповідної області 12В4, бажано взяти у антитіла, який має номер, відповідно до нумерації Kabat ID 005036. Варіабельні області важкого ланцюга людини, які виявляють найвищу ідентичність послідовності до відповідної області 12В4, бажано взяти у антитіла, який має номер, відповідно до нумерації Kabat ID 000333, і антитіла за номером Genbank Accession No.AAB35009, а також антитіла за номером Genbank Accession No.AAD53816, при чому антитіло Kabat ID Number 000333 є більш бажаним.

Потім обираються залишки для заміни, як описано далі. Коли амінокислота відрізняється між варіабельною областю каркасної частини 12В4 і ідентичною зоною варіабельної області каркасної частини антитіла людини, як правило, здійснюють заміну амінокислоти каркасної частини антитіла людини на ідентичну амінокислоту миші, якщо є підстави очікувати, що ця амінокислота:

- (1) нековалентно безпосередньо зв'язує антиген,
- (2) прилягає до CDR ділянки, є частиною CDR-ділянки при альтернативному визначенні, запропонованому Chothia et al., supra, або у інший спосіб взаємодіє з CDR-ділянкою (наприклад, знаходиться на відстані приблизно 3Å А від CDR-ділянки), або
- (3) бере участь в утворенні контакту VL-VH.

Комп'ютерне моделювання варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів 12В4 антитіла, і гуманізація 12В4 антитіла наводяться в Прикладі V. Стисло це можна представити так. Створюється тримірна модель, базуючись на структурі важкого і легкого ланцюгів найближчого розшифрованого антитіла миші. Далі модель

вдосконалюється шляхом кроків, спрямованих на мінімізацію енергії, для того щоб зменшити ймовірність небажаних атомних контактів і щоб оптимізувати електростатичну взаємодію, а також взаємодію за рахунок сил Ван дер Ваальса.

Інформація щодо тримірної структури антитіл, описана тут, є доступною для широкого загалу, наприклад, завдяки базі даних дослідної лабораторії структурної біоінформатики білка (PDB). Ця база даних є вільно досяжною via світову мережу Інтернет і описана Berman et al. (2000) Nucleic Acids Research, 28: 235. Комп'ютерне моделювання дозволяє виявити залишки, здатні взаємодіяти з CDR-ділянкою. Комп'ютерне моделювання структури 12B4 може, таким чином, слугувати відправною точкою для того, щоб передбачити тримірну структуру антитіла, яке включає ділянки 12B4, які визначають комплементарність до антигена (гіперваріабельні ділянки), замінені в структурах каркасної ділянки людини. Можуть бути зконструйовані додаткові моделі, які представляють структуру після здійснення подальших амінокислотних замін.

Загалом, бажано здійснити заміну однієї, більшості або всіх амінокислот, які відповідають критеріям, що були зазначені вище. Відповідно, гуманізовані антитіла даного винаходу завжди будуть містити заміну залишку каркасної ділянки легкого ланцюга людини відповідним залишком 12B4, щонайменше, в 1, 2, 3 або більше обраних положеннях. Гуманізовані антитіла також здебільшого містять заміну залишку каркасної ділянки важкого ланцюга людини відповідним залишком 12B4, щонайменше, в 1, 2, 3 або більше обраних положеннях. Інколи, однак, існує певна невизначеність щодо того, чи буде відповідати цим критеріям окрема амінокислота, і чи будуть продукуватись імуноглобуліни альтернативних варіантів, один з яких має цю заміну, а інший – ні. За умови, що мишачі залишки були б введені замість залишків, які є рідкісними в імуноглобулінах людини в певному положенні, бажано б дослідити активність антитіла, що включає певну заміну або ні. Якщо активність (наприклад, афінність і/або специфічність зв'язування) антитіл, які включають заміну, і тих, що не включають замін, приблизно однакова, може бути надана перевага антитілу, в яке не вводились заміни, оскільки у цьому випадку можна очікувати зменшення НАМА відповіді, як тут описано.

Іншими кандидатами для заміни є амінокислоти каркасної області акцепторного антитіла людини, які є нетиповими для імуноглобуліну людини в цьому положенні. Ці амінокислоти можуть бути замінені амінокислотами, що займають ідентичне положення в більш типових імуноглобулінах людини. Альтернативно, амінокислоти в ідентичних положеннях в 12B4 миші можуть бути введені в каркасні області імуноглобуліну людини, якщо такі амінокислоти типові для імуноглобуліну людини в ідентичному положенні.

Іншими кандидатами для заміни є залишки негаметної лінії, які зустрічаються в каркасній області. Шляхом комп'ютерного порівняння 12B4 з відомими гаметними послідовностями, можуть бути ідентифіковані гаметні послідовності з найвищим ступенем ідентичності послідовності важкому чи легкому ланцюгу. Порівняння первинної структури каркасної частини і гаметної послідовності дасть змогу виявити, які залишки можуть бути обрані для заміни відповідними амінокислотами гаметних залишків. Залишки, які не відповідають між каркасною частиною відібраного акцепторного легкого ланцюга і однією з цих гаметних послідовностей, можуть бути відібрані для заміни відповідними залишками гаметної послідовності.

В таблиці 1 представлені результати аналізу послідовності 12B4 VH і VL областей. Додаткові структури миші і людини, які можуть бути використані для комп'ютерного моделювання 12B4 антитіла, і додаткові антитіла людини наводяться далі, а також гаметні послідовності, які можуть бути використані при доборі амінокислотних замін. Рідкісні залишки миші також наводяться далі в Таблиці 1. Рідкісні мишачі залишки визначаються шляхом порівняння послідовностей донорних VL і/або VH з послідовностями інших членів підгрупи, до яких послідовності донорних VL і/або VH належать (відповідно Kabat) і визначення положення залишку, які відрізняються від консенсусної послідовності. Ці донорські специфічні відмінності можуть вказувати на соматичні мутації, які підвищують активність. Нетипові або рідкісні залишки, розташовані поряд із зв'язуючим центром, можливо, можуть контактувати з антигеном, в зв'язку з чим є бажаним зберегти ці мишачі залишки. Однак, якщо нетиповий мишачий залишок не має істотного значення для зв'язування, слід надати перевагу використанню відповідного акцепторного залишку, оскільки мишачий залишок може створювати імуногенні неопітопи в гуманізованому антитілі. За умови, коли нетиповий залишок в донорній послідовності дійсно є поширеним залишком у відповідній акцепторній послідовності, цілком очевидно, що бажаним є акцепторний залишок.

Таблиця 1

Резюме послідовності 12B4 V-області

Ланцюг	VL	VH
Підгрупа миші	II	Ib
Підгрупа людини	II	II
Рідкісні амінокислоти (% частоти)	K107 (0.542%)	T3,I11,L12,F24, S41,N75,D83,A85
Chothia канонічний клас	L1: ~клас 4 [1rmf] L2: клас 1 [1lmk] L3: клас 1 [1tet]	HI: class 3 [Iggi] H2: ~class 1

Найближче мишаче MAb з розшифрованою структурою	2PCP (2.2Å)	1ETZ(2.6Å)
Гомологія з моделюючою матрицею	94%	80%
Послідовність каркасної частини людини	KABID 005036	1-KABID 000333 2-AAB35009/1F7 3-AAD53816
Гаметна реф-лінія для F _g гуманізованого антитіла	A3/X12690& A19/X63397	1: VH4- 39/AB019439/ BAA75036.1 2: VH2-5/AB019440/ BAA75057.1

Kabat ID послідовності, згадані тут, є загальнодоступними, наприклад, завдяки базі даних білків, що становлять імунологічний інтерес відділу біомедичної інженерії Північно-Західного Університету. Інформація про тримірну структуру антитіла, тут наведена, є доступною для широкого загалу, наприклад, завдяки базі даних дослідної лабораторії структурної біоінформатики білка (PDB). PDB є вільно доступною via світову мережу Інтернет і описана Berman et al. (2000) *Nucleic Acids Research*, p235-242. Послідовності генів гаметної лінії, згадані тут, є загально відомими, наприклад, завдяки базі даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) стосовно послідовностей в колекціях Igh, Ig каппа і Ig Ілямбда гаметної лінії V генів (як відділення Національної Бібліотеки Медицини (NLM) в Національному Інституті Здоров'я (NIH)). Дослідження гомології "генам гаметної лінії Ig " бази даних NCBI забезпечується програмою IgG BLAST™.

У найкращому втіленні, гуманізоване антитіло даного винаходу складається (i) з легкого ланцюга, який включає варіабельний домен, що містить CDR-ділянки 12B4 VL миші і акцепторну каркасну частину людини, каркасна частина має щонайменше один залишок, заміщений відповідним залишком 12B4 і (ii) важкий ланцюг, що містить CDR-ділянки 12B4 VH і акцепторну каркасну частину людини, каркасна частина має щонайменше один, краще два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім або дев'ять залишків, заміщених відповідним залишком 12B4, і, на вибір, щонайменше, один, краще два або три залишки, заміщені відповідним залишком гаметної лінії людини.

В іншому бажаному втіленні, гуманізоване антитіло даного винаходу має структурні особливості, як тут описано, і, крім того, виявляє, принаймні, один (краще два, три, чотири або всі) з наступних видів активності: (1) зв'язує розчинний Aβ; (2) зв'язує агрегований Aβ1-42 (наприклад, як визначено за допомогою імуноферментного аналізу ELISA); (3) зв'язує Aβ в бляшках (наприклад, забарвлювання зрізів мозкової тканини пацієнтів з хворобою Альцгеймера і/або зрізів мозку мишей PDAPP-лінії); (4) зв'язує Aβ з афінністю, яка в 2-3 рази вища у порівнянні з химерним 12B4 (наприклад, 12B4, яке несе послідовності варіабельної області миші і послідовності константної області людини); (5) є посередником фагоцитозу Aβ (наприклад, при дослідженні фагоцитозу ex vivo, як тут описано); і (6) має здатність долати гематоенцефалічний бар'єр (наприклад, виявляє короткий час локалізації в мозку, наприклад, в PDAPP тваринній моделі, як тут описано).

В іншому бажаному втіленні, гуманізоване антитіло даного винаходу має структурні особливості, як тут описано, певною мірою зв'язує Aβ або зв'язує афінністю, здатною викликати in vivo, принаймні, один з наступних ефектів: (1) зменшувати накопичення Aβ бляшок; (2) запобігати утворенню бляшок; (3) знижувати рівень розчинного Aβ; (4) зменшувати патологічні зміни нервової тканини, пов'язані з амілоїдогенним розладом; (5) зменшувати або покращувати, принаймні, один фізіологічний симптом, пов'язаний з амілоїдогенним розладом; і/або (6) покращувати когнітивні функції.

В іншому бажаному втіленні, гуманізоване антитіло даного винаходу має структурні особливості, як тут описано, і специфічно зв'язується з епітопом, який включає 3-7 залишки Aβ.

В іншому бажаному втіленні, гуманізоване антитіло даного винаходу має структурні особливості, як тут описано, зв'язується з N-кінцевим епітопом Aβ (наприклад, зв'язується з епітопом в межах 3-7 амінокислот Aβ), і здатне зменшувати (1) рівень Aβ пептиду; (2) накопичення Aβ бляшок; і (3) невритичні зміни або дистрофію нервової тканини, пов'язану з амілоїдогенним розладом.

Види активності, описані вище, можуть бути визначені за допомогою одного з численних методів, описаних тут або в імунології (наприклад, дослідження зв'язування, дослідження фагоцитозу і т.п.). Активність антитіла може бути досліджена або за допомогою аналізу in vivo (наприклад, використовуючи мічені компоненти і/або методики візуалізації), або в культурі in vitro (наприклад, використовуючи зразки або препарати, що були взяті у суб'єкта). Активність може бути досліджена прямо або опосередковано. В певних бажаних втіленнях, неврологічні розлади (наприклад, амілоїдні відкладення, невритичні відкладення, тощо) аналізуються. Такі розлади можуть бути досліджені на живих об'єктах (наприклад, на тваринній моделі хвороби Альцгеймера, або у людей, наприклад, щодо яких було застосовано імунотерапію) використовуючи методики безболісного визначення. Альтернативно, такі розлади можуть бути досліджені у суб'єктів після смерті. Дослідження таких розладів на тваринних моделях і/або на людях після смерті корисне для оцінки ефективності різних препаратів (наприклад, гуманізованих антитіл), які повинні використовуватись в подібних імунотерапевтичних застосуваннях. В інших бажаних застосуваннях, поведінка або неврологічні параметри можуть розглядатись як індикатори вищезгаданої невропатологічної активності або розладів.

3. Виготовлення варіабельних областей

При наявності концептуально підібраних CDR-ділянки і каркасної частини гуманізованих імуноглобулінів, є

ціла низка методів для отримання таких імуноглобулінів. Завдяки виродженості генетичного коду, численна кількість послідовностей нуклеїнової кислоти кодуватиме кожну амінокислотну послідовність імуноглобуліну. Бажані послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути отримані *de novo* за допомогою твердофазного синтезу ДНК або шляхом PCR-мутагенезу заздалегідь виготовленого варіанту бажаного полінуклеотиду.

Мутагенез з використанням олігонуклеотидів - це той метод, якому слід надати перевагу при здійсненні заміни, делецій і отримання інсерційних сегментів в поліпептид-мішені ДНК. Див. Adelman et al., DNA 2: 183 (1983). Якщо говорити стисло, поліпептид-мішень ДНК змінюється шляхом гібридизації олігонуклеотиду, який кодує бажану мутацію до односторонньої матриці ДНК. Після гібридизації, використовується ДНК-полімераза, для того щоб відбувся синтез цілісного комплементарного ланцюга матриці, яка заключав в собі олігонуклеотидний праймер, і кодує задану зміну в поліпептид-мішені ДНК.

4. Підбір константних областей

Варіабельні сегменти антитіл, утворені, як описано *supra* (наприклад, варіабельні області важкого і легкого ланцюга химерних або гуманізованих антитіл) в типовому випадку зв'язані, принаймні, з частиною константної області імуноглобуліну (Fc область), як правило, тієї, що належить імуноглобуліну людини. ДНК-послідовність константної області імуноглобуліну людини може бути ізольована за загальноприйнятими методиками з численної групи клітин людини, однак бажано надавати перевагу імуорталізованим В-лімфоцитам (див. Kabat et al., *supra*, and Liu et al., WO 87/02671) (кожна з яких включена як довідкова інформація у повному обсязі для використання з будь-якою метою). Зазвичай, антитіло має включати константні ділянки як легкого, так і важкого ланцюгів. Константна ділянка важкого ланцюга, як правило, складається з CH1, шарнірної, CH2, CH3, і CH4 ділянок. Антитіла, описані тут, включають антитіла, які мають константні області всіх типів, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-який ізотип, включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Якщо бажано, щоб антитіло (наприклад, гуманізоване антитіло) проявляло цитотоксичну активність, константний домен, як правило, є компонентом, який утримує константний домен, і в типовому випадку належить до IgG1 класу. Ізотип IgG1 імуноглобуліну людини бажаний. Константні області легкого ланцюга можуть бути лямбда або каппа. Гуманізоване антитіло може включати послідовності більш, ніж з одного класу або ізотипу. Антитіла можуть експресуватись як тетрамери, що складаються з двох легких і двох важких ланцюгів, як окремі важкі ланцюги, легкі ланцюги, як Fab, Fab' F(ab')₂, і Fv, або як антитіла, утворені поодинокими ланцюгами, в яких варіабельні домени важкого і легкого ланцюга з'єднані спейсером.

5. Експресія рекомбінантних антитіл

Химерні і гуманізовані антитіла в типовому випадку утворюються внаслідок рекомбінантної експресії. Нуклеїнові кислоти, які кодують варіабельні області легкого і важкого ланцюга, які необов'язково зв'язані з константними ділянками, вбудовуються в вектори експресії. Легкі і важкі ланцюги можуть клонуватись з використанням одного або різних експресуючих векторів. Сегменти ДНК, які кодують ланцюги імуноглобуліну, операбельно пов'язані з контролюючими послідовностями в векторі (рах) експресії, які забезпечують експресію поліпептидів імуноглобуліну. Контролюючі послідовності експресії включають, але не обмежені ними, промотори (наприклад, зв'язані природно або гетерологічні промотори), сигнальні послідовності, елементи енансера, і послідовності завершення транскрипції. Переважно, послідовності, які контролюють експресію, є промоторними системами еукаріотів в векторах, здатних до трансформації або трансфекції еукаріотних клітин-господарів. Після введення вектора в прийнятного господаря, господар утримується в умовах, що забезпечують високий рівень експресії нуклеотидних послідовностей, збирання та очистки перехреснореагуючих антитіл.

Ці вектори експресії, типово, реплікуються в організм господаря або як епісоми або як інтегральна частина хромосомальної ДНК господаря. Як правило, вектори експресії включають маркери селекції (наприклад, ампіцилін-резистентності, гіроміцин-резистентності, тетрациклін-резистентності, канаміцин-резистентності або неоміцин-резистентності), для того щоб виявити ті клітини, які містять трансформовану ДНК з заданою послідовністю (див., наприклад, Itakura et al., US Patent 4,704,362)

E. coli - один з прокаріотів, який є надзвичайно корисним для клонування полінуклеотидів (наприклад, ДНК послідовностей) в даному винаході. Інші мікроорганізми, які можуть бути корисними для використання як господарі, включають бацили, такі як *Bacillus subtilis*, та інші представники родини *Enterobacteriaceae*, такі як *Salmonella*, *Serratia*, а також різні види *Pseudomonas*. В цих господарях-прокаріотах, також можна зробити вектори експресії, які в типовому випадку включають послідовності, що контролюють експресію, які сумісні з клітиною господаря (наприклад, сайт ініціації реплікації). До того ж, може бути присутнє будь-яке число добре відомих промоторів, таких як система промотора лактози, система промотора триптофану, система промотора бета-лактамази, або система промотора фага лямбда. Промотори типово повинні контролювати експресію, як правило, обов'язково з послідовністю оператора, і мають послідовності рибосомального зв'язуючого центра і т.п. для ініціації і завершення транскрипції і трансляції.

Інші мікроорганізми, такі як дріжджі, також можуть бути використані для експресії. *Saccharomyces* є прийнятний господар з прийнятними векторами, які мають послідовності, що контролюють експресію (наприклад, промотори), сайт ініціації реплікації, термінальну ділянку, тощо, як бажано. До типових промоторів належать 3-фосфогліцераткіназа та інші гліколітичні ферменти. Промотори індукційних дріжджів включають, серед інших, промотори алкогольдегідрогенази, ізоцитохрому C, ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози і галактози.

Крім мікроорганізмів, культура клітин тканин ссавців також може бути використана для експресії і утворення поліпептидів даного винаходу (наприклад, полінуклеотидів, які кодує імуноглобуліни або його фрагменти). Див. Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Наразі віддається перевага клітинам еукаріотів, тому що ціла низка придатних клітинних ліній господаря, здатних до секреції гетерологічних протеїнів (наприклад, інтактних імуноглобулінів) була отримана в галузі, яка включає СНО клітинні лінії, різноманітні *Cos* клітинні лінії, HeLa клітини, переважно, мієломні клітинні лінії, або трансформовані В-лімфоцити або гібридоми. Як правило, ці клітини не належать людині. Вектори експресії для цих клітин можуть включати послідовності, що контролюють експресію, такі як сайт ініціації реплікації,

промотор і енхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)), і сайти, необхідні для процесингу інформації, такі як сайти, що зв'язують рибосоми, сайти сплайсингу РНК, сайти поліаденілювання, і послідовності термінатора транскрипції. Здебільшого послідовності, які контролюють експресію, - це промотори, що походять з генів імуноглобуліну, SV40, аденовірусу, вірусу бичачої папіломи, цитомегаловірусу і т.п.. Див. Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992).

Альтернативно, послідовності, які кодують антитіло, мають бути включені в трансгени для введення в геном трансгенної тварини і наступної експресії в молоко трансгенної тварини (див, наприклад, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, and Meade et al., US 5,849,992). Прийнятні трансгени включають кодуючі послідовності для легкого і/або важкого ланцюгів в оперативно зчепленні з промотором і енхансером специфічного гена молочної залози, такого як казеїн або лактоглобулін.

Вектори, які включають полінуклеотидні послідовності, що становлять інтерес, (наприклад, послідовності, що кодують важкий і легкий ланцюг, а також послідовності, що контролюють експресію) можуть бути перенесені в клітину-господаря за допомогою загально відомих методів, які можуть бути різними в залежності від типу клітини. Наприклад, трансфекція хлориду кальцію широко використовується для клітин прокаріотів, тоді як щодо інших типів клітин можуть бути застосовані такі методи, як обробка фосфатом кальцію, електропорація, ліпофекція, біолистикс або вірусна трансфекція. (Див. звичайно Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989) (наведені тут як довідкова інформація у повному обсязі для використання з будь-якою метою). Інші методи, які використовуються для трансформації клітин ссавців, включають використання полібрену, злиття протопластів, ліпосоми, електропорацію і мікроін'єкції (див. звичайно, Sambrook et al., supra).

Для отримання трансгенних тварин, трансгени можуть бути введені шляхом мікроін'єкції в запліднені ооцити, або можуть бути вмонтовані в геном ембріональних стовбурових клітин, після чого ядра таких клітин переносяться в безядерні ооцити (цитопласти).

Якщо важкий і легкий ланцюги клонуються на різних векторах експресії, здійснюють одночасну трансфекцію цих векторів, для того щоб отримати експресію і утворення інтактних імуноглобулінів.

Після експресії повні антитіла, їх димери, окремі важкі і легкі ланцюги, або інші форми імуноглобуліну даного винаходу можуть бути очищені відповідно до стандартних методик галузі, включаючи преципітацію сульфатом амонію, афінну хроматографію, хроматографію на колонках, очистку за допомогою високочутливої рідинної хроматографії, електрофорезу в гелі і т.п. (див., звичайно Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). По суті, бажано використовувати чисті імуноглобуліни, однорідність популяції яких або моноклональність яких становить, принаймні, від 90 до 95%, для фармацевтичних потреб бажано використовувати імуноглобуліни, моноклональність яких становить від 98 до 99% і більше.

6. Фрагменти антитіла

В рамках даного винаходу розглядаються також фрагменти антитіла. В одному втіленні передбачено отримання фрагментів, що не належать людині, і/або химерних антитіл. В іншому втіленні, передбачено отримання фрагментів гуманізованих антитіл. Типово ці фрагменти виявляють специфічне зв'язування з антигеном з афінністю, принаймні, 10^7 , більш типово 10^8 або $10^9 M^{-1}$. Фрагменти гуманізованого антитіла включають поодинокі важкі ланцюги, легкі ланцюги, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, і Fv. Фрагменти отримують за допомогою методик рекомбінантних ДНК, або шляхом ферментного або хімічного фракціонування інтактних імуноглобулінів.

7. Дослідження терапевтичної ефективності антитіл на тваринній моделі

Групам мишей лінії PDAPP, 7-9-місячного віку шляхом ін'єкції вводили 0.5мг в PBS поліклональних анти-Аβ або специфічних анти-Аβ моноклональних антитіл. Всі препарати антитіла зазнають очистки, для того щоб забезпечити низький рівень ендотоксинів. Моноклональні антитіла можуть бути отримані проти фрагменту, при введенні мишам шляхом ін'єкції фрагменту або довшої форми Аβ, далі отримують гібридами і здійснюють скринінг гібридом на антитіло, яке специфічно зв'язує певний фрагмент Аβ без зв'язування з іншими фрагментами Аβ, які не перекиваються.

Ін'єкції мишам вводять внутрішньоочеревинно, як потрібно, з інтервалом в 4 місяці, для того щоб підтримувати концентрацію циркулюючого антитіла, яка вимірюється за допомогою методу імуноферментного аналізу ELISA, титр антитіл становить більше, ніж 1/1000, як визначено за допомогою ELISA, до Аβ42 або іншого імуногена. За титрами антитіл ведеться спостереження, мишей безболісно умертвляли наприкінці 6 місяця після початку введення ін'єкцій. Гістохімічні, токсикологічні дослідження, а також визначення рівня Аβ було проведено посмертно. В кожній групі було використано по 10 мишей.

8. Скринінг антитіл на здатність очищати амілоїдні відкладення

Винахід також представляє методи скринінгу антитіла на активність виводити амілоїдні відкладення або інші антигени, або зв'язані біологічні об'єкти, які повинні зазнати виведення або очищення. Для того, щоб дослідити активність антитіл проти амілоїдних відкладень, зразок тканини мозку пацієнта з хворобою Альцгеймера або модельної тварини з проявами патології альцгеймерівського типу контактує з фагоцитами, які несуть Fc-рецептор, такими як мікрогліальні клітини, і досліджувані антитілом в культурі in vitro. Фагоцити можуть представляти первинну культуру або клітинну лінію і можуть належати миші (наприклад, BV-2 або C8-B4 клітини) або людини (наприклад, THP-1 клітини). В деяких методах, компоненти монтуються на мікроскопічному препараті, для того щоб полегшити моніторинг за допомогою мікроскопа. В інших методах, різноманітні реакції здійснюються паралельно в лунках планшета. В такому форматі окремі мініатюрні мікроскопічні препарати можуть бути розміщені в окремих мікролунках планшета. Може також бути використаний немікроскопічний формат, такий як виявлення Аβ за допомогою імуноферментного аналізу ELISA. Переважно, проводиться серія вимірів кількості амілоїдних відкладень в реактивній суміші in vitro, починаючи з початкового значення до початку реакції, і одного або кількох значень, отриманих протягом реакції. Антиген може бути виявлений шляхом фарбування, наприклад, міченими флуоресцентними барвниками, антитіла до Аβ або до інших компонентів амілоїдних бляшок Як антитіла, що використовуються для фарбування, можуть бути використані ті ж антитіла, здатність до кліренсу яких вивчається Зменшення

амілоїдних відкладень відносно початкового значення протягом реакції свідчить про те, що досліджуване антитіло має здатність до кліренсу. Такі антитіла, ймовірно, будуть корисними для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера або інших амілоїдогенних захворювань. Особливо корисними для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера або інших амілоїдогенних захворювань будуть антитіла, здатні викликати кліренс як компактних, так і дифузних амілоїдних бляшок, наприклад, 12B4 антитіло даного винаходу, або його химерна чи гуманізована версія.

Аналогічні методи можуть бути використані для скринінгу антитіл на активність руйнувати інші типи біологічних об'єктів. Аналіз може бути використаний для виявлення руйнуючої здатності антитіла фактично проти будь-якого біологічного об'єкту. Типово, біологічний об'єкт відіграє однакову роль у виникненні хвороби у людини чи тварини. Біологічний об'єкт може бути представлений у вигляді препарату тканини або у ізольованому вигляді. Якщо це препарат тканини, він переважно не піддається фіксації, для того щоб забезпечити легкий доступ до компонентів зразка тканини і уникнути появи артефактів. Як приклади тканин, які можуть бути використані в цьому дослідженні, можна навести ракову тканину, передракову тканину, тканину, яка містить доброякісні новоутворення, такі як бородавки чи родимки, тканину, інфіковану патогенними мікроорганізмами, тканину, що містить клітини зони запалення (запального інфільтрату), тканину, що несе патологічну міжклітинну речовину (наприклад, фібринозний перикардит), тканину, що несе аберрантні антигени, і тканину рубців. Приклади ізольованих біологічних об'єктів, які можуть бути використані, включають Аβ, вірусні антигени або віруси, протеоглікани, антигени інших патогенних мікроорганізмів, пухлинні антигени, і молекули адгезії. Такі антигени можуть мати природне походження, бути одержані за рахунок експресії рекомбінантних ДНК або хімічного синтезу, серед інших засобів. Зразки тканини або ізольовані біологічні об'єкти приводять в контакт з фагоцитами, що несуть Fc рецептори, такими як мікрогліальні клітини або антитіла, які повинні бути досліджені в культуральному середовищі. Антитіло може бути спрямоване на досліджуваний біологічний об'єкт або на антиген, зв'язаний з цим об'єктом. В останньому випадку метою дослідження є те, чи фагоцитується біологічний об'єкт антигеном. Як правило, хоча це й не є обов'язковим, антитіло і біологічний об'єкт (інколи із зв'язаним антигеном), контактують один з одним ще до того, як до середовища додають фагоцити. Далі здійснюється моніторинг концентрації біологічного об'єкта і/або зв'язаного антигена, що залишаються в середовищі, якщо вони присутні. Зменшення кількості або концентрації антигена або зв'язаного біологічного об'єкта в середовищі свідчить про те, що антитіло виявляє "очищуючу" відповідь проти антигена і/або зв'язаного біологічного об'єкта у поєднанні з фагоцитами (див., наприклад, Приклад IV).

9. Химерні/Гуманізовані антитіла, які мають змінені ефекторні функції

Для вищеписаних антитіл винаходу, які включають константну область (Fc область), могло б також бути бажаним змінювати ефекторні функції молекули. Як правило, ефекторні функції залишків антитіла в константній або Fc області молекули, яка може бути посередником зв'язування з різними ефекторними молекулами, наприклад, білками комплемента або Fc-рецепторами. Зв'язування комплемента з Fc областю є важливим, наприклад, для опсонізації і лізису клітин патогена, а також активації запальної реакції. Зв'язування антитіла з Fc рецепторами, наприклад, на поверхні ефекторних клітин, може приводити в дію цілу низку важливих і різноманітних біологічних реакцій, наприклад, поглинання і деструкцію патогенів і часточок, навантажених антитілами, кліренс імунних комплексів, лізис клітинами-кілерами клітин-мішеней, навантажених антитілами (наприклад, антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність, або ADCC), секрецію медіаторів запалення, плацентарний перенос антитіл, контроль за утворенням імуноглобуліну.

Відповідно, залежно від конкретного терапевтичного або діагностичного застосування, вищезгадані імунні функції, або лише певні імунні функції, можуть бути бажаними. Шляхом зміни Fc ділянки антитіла, було досягнуто різних аспектів зміни ефекторних функцій молекули, включаючи підсилення або пригнічення різних реакцій імунної системи, зі сприятливим ефектом в діагностиці і лікуванні.

Можуть бути отримані антитіла винаходу, які реагують лише з певним типом Fc рецепторів, наприклад, антитіла винаходу можуть бути модифіковані, для того щоб зв'язуватись лише з певними Fc рецепторами, або, якщо це бажано, повністю втратити здатність до зв'язування з Fc рецептором шляхом делеції або альтерації центру зв'язування Fc рецептора, локалізованого в Fc області антитіла. Інші бажані альтерації Fc області антитіла винаходу наведені нижче. Типово, система нумерації Kabat використовується для того, щоб визначити, який амінокислотний залишок(ки) Fc області (наприклад, IgG антитіла) змінюється (наприклад, шляхом амінокислотних замінів), для того щоб досягти бажаної зміни ефекторної функції. Система нумерації також використовується для того, щоб порівняти антитіла різних видів, так, щоб бажані ефекторні функції, які притаманні, наприклад, мишачим антитілам, можна було після цього систематично конструювати в антитілах людини, гуманізованих або химерних антитілах винаходу.

Наприклад, було встановлено, що антитіла (наприклад, IgG антитіла) можуть бути згруповані на основі їх здатності до сильного, проміжного або слабого зв'язування з Fc рецептором (наприклад, Fc рецептором на моноцитах людини (FcγRI)). Шляхом порівняння амінокислотних послідовностей в цих групах, які відрізняються різною афінністю, центр зв'язування моноцитів в шарнірній області (Leu234-Ser239) було визначено. Крім того, рецептор FcγRI людини зв'язує IgG1 людини і IgG2a миші як мономер, однак зв'язування IgG2b миші відбувається в 100 разів слабкіше. Порівняння амінокислотних послідовностей цих білків в шарнірній області показало, що послідовність 234 до 238, наприклад, Лей-Лей-Глі-Глі-Про, у антитіл, які здатні до сильного зв'язування, змінюється на Лей-Глу-Глі-Глі-Про в ланцюзі миші гамма 2b, наприклад, антитіла, для якого характерне слабе зв'язування. Тобто, відповідні зміни послідовності шарнірної області антитіла людини можуть бути зроблені, якщо є бажаним послаблене зв'язування з FcγRI рецептором. Зрозуміло, що інші альтерації також можуть бути виконані, для того щоб досягти такого ж або подібного результату. Наприклад, афінність FcγRI може бути змінена шляхом заміни визначеного залишку, залишком, який має невідповідну функціональну групу на його бічних ланцюгах, або шляхом введення зарядженої функціональної групи (наприклад, Глу або Асп) або, наприклад, ароматичного неполярного залишку (наприклад, фенілаланіну, тирозину або триптофану).

Ці зміни однаковою мірою можуть бути застосовані в системах послідовностей миші, людини і щура, які виявляють гомологію послідовності між різними імуноглобулінами. Було показано, що для IgG3 людини, яке зв'язується з FcγRI рецептором людини, заміна Лей 235 на Глу порушує взаємодію мутанта з рецептором. Таким чином, зв'язуючий центр для цього рецептора може "вмикатись" або "вимикатись" внаслідок відповідних мутацій.

Мутації на прилеглих або близьких сайтах шарнірної області (наприклад, заміщення залишків 234, 236 або 237 на Ала) свідчить, що альтерації залишків 234, 235, 236, і 237, принаймні, впливають на афінність до FcγRI рецептора. Відповідно, антитіла винаходу також можуть мати змінену Fc область із зміненою афінністю до FcγRI у порівнянні з немодифікованим антитілом. Таке антитіло просто має модифікацію амінокислотного залишку 234, 235, 236, або 237.

Спорідненість до інших Fc рецепторів може бути змінена за допомогою подібного підходу, наприклад, для контролю імунної реакції у різних способів.

Як наступний приклад, лізисні властивості IgG антитіл, які проявляються після зв'язування C1 компонента комплементу, можуть бути змінені.

Перший компонент системи комплементу, C1, включає три білки, відомі як C1q, C1r і C1s, що міцно зв'язані один з одним. Було показано, що C1q відповідальний за зв'язування комплексу, утвореного трьома білками, з антитілом.

Відповідно, C1q-зв'язуюча активність антитіла може бути змінена шляхом зміни CН2 домену антитіла, в якому, принаймні, один з амінокислотних залишків 318, 320, і 322 важкого ланцюга був змінений на залишок, який має інший бічний ланцюг. Нумерація залишків важкого ланцюга здійснюється відповідно до EU індексу (див. Kabat et al., supra). Ще одна прийнятна заміна, наприклад, зменшення або відміна специфічного C1q-зв'язування з антитілом, включає заміну будь-якого серед залишків 318 (Глу), 320 (Ліз) і 322 (Ліз), на Ала.

Крім того, шляхом мутаційних змін цих залишків було показано, що C1q-зв'язування зберігається стільки, скільки залишок 318 має бічний ланцюг, який утримується за допомогою водневого зв'язку, і кожен з залишків 320 і 322 має позитивно заряджені бічні ланцюги.

C1q-зв'язуюча активність може бути скасована внаслідок заміни будь-якого з трьох визначених залишків на залишок, бічні ланцюги якого мають невідповідну сукупність функціональних характеристик. Не обов'язково замінювати іонні залишки лише на Ала, для того щоб скасувати C1q-зв'язування. Можливим також є використання інших алкіл-заміщених неіонних залишків, таких як гліцин, ізолейцин, лейцин, або валін, або таких ароматичних неполярних залишків як фенілаланін, тирозин, триптофан і пролін на місці будь-якого з трьох залишків, для того щоб скасувати C1q-зв'язування. Крім того, можна також використовувати такі полярні неіонні залишки, як серин, треонін, цистеїн і метионін на місці залишків 320 і 322, але не 318, для того щоб скасувати C1q-зв'язуючу активність.

Також зазначається, що бічні ланцюги іонних або неіонних полярних залишків будуть здатні утворювати водневі зв'язки у спосіб, подібний до зв'язків, які утворює залишок гліцину. Тому, заміна 318 (Глу) залишку полярним залишком може модифікувати, але не скасувати C1q-зв'язуючу активність.

Відомо також, що заміна залишку 297 (Асн) на Ала призводить до втрати здатності до лізису, в той час лише дещо зменшуючи (приблизно втричі) спорідненість до C1q. Ця зміна порушує центр глікозилювання і наявність вуглеводу, який потрібен для активації комплементу. Будь-яка інша заміна в цьому сайті також порушить центр глікозилювання.

Винахід також представляє антитіло, яке має змінені ефекторні функції, де антитіло має модифіковану шарнірну область. Модифікована шарнірна область може представляти повну шарнірну область, яка походить від антитіла іншого класу або підкласу, ніж антитіло, якому належить CН1 домен. Наприклад, константний домен (CН1) антитіла IgG класу може бути прикріплений до шарнірної області антитіла IgG4 класу. Альтернативно, нова шарнірна область може становити частину природної шарнірної зони або одиницю, що повторюється, в якій кожна одиниця повтору походить з природної шарнірної області. В одному прикладі, природна шарнірна область змінюється шляхом конверсії одного або кількох цистеїнових залишків на нейтральні залишки, такі як аланін, або шляхом конверсії належним чином розташованих залишків на місце цистеїнових залишків. Такі зміни виконуються з використанням методів хімії білків і, головним чином, методів генетичної інженерії, як тут описано.

В одному втіленні винаходу, низка цистеїнових залишків в шарнірній області зменшується, наприклад, до одного залишку цистеїну. Ця модифікація має перевагу при полегшенні збирання молекул антитіла, наприклад, молекул біспецифічного антитіла і молекул антитіла, де Fc частина замінена молекулою ефектора або репортерною групою, оскільки це єдине, що необхідне для того, щоб утворився єдиний дисульфідний зв'язок. Ця модифікація також забезпечує специфічну мішень для прикріплення шарнірної області до іншої шарнірної області або до молекули ефектора чи репортерної групи, прямо або опосередковано, наприклад, з використанням хімічних засобів.

Навпаки, низка цистеїнових залишків в шарнірній області антитіла збільшується, наприклад, принаймні, на один залишок, ніж це зазвичай притаманно для цього залишку. Збільшення числа цистеїнових залишків може бути використано для стабілізації взаємодії між прилеглими шарнірними областями. Інша перевага цієї модифікації полягає в тому, що вона спрощує використання цистеїн-тіолових груп для прикріплення молекули ефектора або репортерної групи до зміненого антитіла, міченого радіоактивною мішкою.

Відповідно, винахід забезпечує обмін шарнірними областями між антитілами різних класів, зокрема, IgG класів, і/або збільшення або зменшення числа цистеїнових залишків в шарнірній області для того, щоб досягти зміни ефекторних функцій (див., наприклад, U.S. Patent No. 5,677,425, який повністю включений тут). Визначення зміненої ефекторної функції антитіла виконується з використанням методів аналізу, описаних тут, або методик, прийнятих в інших галузях.

Важливо, що отримане внаслідок цього антитіло, може підлягати одному або кільком способам аналізу для оцінки будь-якої зміни біологічної активності у порівнянні з вихідним антитілом. Наприклад, здатність антитіла із зміненою Fc ділянкою зв'язувати комплемент або Fc рецептори може бути оцінена за допомогою

методів аналізу, висвітлених тут, а також за допомогою будь-якого іншого методу, прийнятого в цій галузі.

Виготовлення антитіл винаходу виконується з використанням будь-якої прийнятної методики, включаючи методики, які тут описані, а також методики, відомої тим, хто має досвід в цій галузі. Наприклад, прийнятна амінокислотна послідовність, наприклад, CH₂, і/або CH₃ домен(и) антитіла, і включає належним чином змінений залишок(ки), може бути синтезована, а потім за допомогою хімічних засобів приєднана до відповідного місця молекули антитіла.

Переважно, для виготовлення змінених антитіл використовують методи генетичної інженерії. Ці методики включають, наприклад, виготовлення прийнятних праймерів для використання в полімеразній реакції синтезу ланцюга (PCR), так що послідовність ДНК, яка кодує, принаймні, частину важкого ланцюга IgG, наприклад, Fc або константну область (наприклад, CH₂, і/або CH₃) змінюється в одному або кількох залишках. Після цього сегмент може бути оперативно зв'язаний з іншою частиною антитіла, наприклад, варіабельною областю антитіла і регуляторними елементами, потрібними для експресії в клітині.

Даний винахід також включає вектори, які використовуються для трансформації клітинної лінії, вектори, які використовуються для виготовлення трансформуючих векторів, клітинні лінії, трансформовані з використанням трансформуючих векторів, клітинні лінії, трансформовані з використанням попередніх векторів, і методи для їх виготовлення.

Переважно, клітинна лінія, яка трансформується, для того щоб продукувати антитіла із зміненою Fc-областю (наприклад, із зміненою ефекторною функцією), представляє собою іморталізовану клітинну лінію ссавців (наприклад, CHO клітина).

Не зважаючи на те що клітинна лінія, яка використовується для того, щоб продукувати антитіла із зміненою Fc-областю, переважно це клітинна лінія ссавців, будь-яка інша прийнятна клітинна лінія, така як лінія бактеріальних клітин або дріжджова клітинна лінія, може альтернативно бути використана.

В. Нуклеїнова кислота, яка кодує імунологічні і терапевтичні препарати

Імунна відповідь проти амілоїдних відкладень також може бути індукована шляхом введення нуклеїнових кислот, що кодують антитіла або компоненти їх ланцюгів, які використовуються для пасивної імунізації. Такими нуклеїновими кислотами можуть бути ДНК або РНК. Сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує імуноген, як правило, зв'язаний з регуляторними елементами, такими як промотор і ген-енхансер, що робить можливою експресію сегменту ДНК в задані клітини-мішені пацієнта. Для експресії в клітині крові, оскільки це бажано для індукування імунної відповіді, прийнятними для прямої експресії є елементи промотора і енхансера генів важкого або легкого ланцюгів імуноглобуліну або головного промотора і енхансера вірусу мозаїки цвітної капуста (CMV). Зв'язані регуляторні елементи і кодуючі послідовності часто клонуються в вектор. Для введення двохланцюгових антитіл два ланцюги можуть клонуватись в одному й тому ж або окремих векторах.

Наявна ціла низка вірусних векторних систем, включаючи ретровірусні системи (див., наприклад, Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3: 102-109 (1993)); аденовірусні вектори (див., наприклад, Bett et al., *J. Virol.* 67: 5911 (1993)); вектори, асоційовані з аденовірусом (див., наприклад, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179: 1867 (1994)), вірусні вектори з родини поксвірусів, включаючи вірус вісповакцини і поксвіруси птахів, вірусні вектори з роду альфа вірусів, на зразок тих, що походять від Сіндбіс вірусу і вірусу енцефаліту лісу Семлікі (див. Dubensky et al., *J. Virol.* 70: 508 (1996)), вірусу венесуельського енцефаліту коней (див. Johnston et al., *US* 5,643,576) рабдовірусів, таких як вірус везикулярного стоматиту (див. Rose, 6,168,943) і віруси папіломи (One et al., *Human Gene Therapy* 6: 325 (1995); Woo et al., *WO* 94/12629 and Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ДНК, яка кодує імуноген, або вектор, що включає цю ж ДНК, можуть бути упаковані в ліпосоми. Придатні ліпіди і пов'язані аналоги описують Eppstein et al., *US* 5,208,036, Feigner et al., *US* 5,264,618, Rose, *US* 5,279,833, and Erand et al., *US* 5,283,185. Вектори і ДНК, кодуюча імуноген, можуть бути адсорбовані або зв'язані з мікрочастинками носіїв, прикладом яких є полімери поліметилметакрилат і полілактиди, а також полі(лактиди-ко-гліколіди), див., наприклад, McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996).

Вектори генної терапії або "голі" поліпептиди (наприклад, ДНК) можуть бути доставлені *in vivo* шляхом введення окремому пацієнту, як правило, шляхом системного введення (наприклад, внутрішньовенно, інтраперитонеально, через ніс, через шлунок, внутрішньошкірно, внутрішньом'язово, підшкірно чи інтракраніально) або місцевого застосування (див., наприклад, Anderson et al., *US* 5,399,346). Термін "голий нуклеотид" стосується полінуклеотиду, не зв'язаного з колоїдною речовиною. Голі нуклеотиди інколи клонуються в векторах плазмід. Такі вектори, крім того, можуть включати анестезуючу речовину, таку як бупівакаїн (Weiner et al., *US* 5,593,972). ДНК також може бути включена за допомогою методу генного "дробовика". Див. Xiao & Brandsma, *supra*. ДНК, яка кодує імуноген, осаджується на поверхні металевих мікрогранул. Мікроскопічні "кулі" прискорюються шоковою хвилею або за допомогою гелію, що розширюється, і проникають в тканину на глибину кількох шарів клітин. Наприклад, для виконання спрямованого трансгенезу придатний прилад The Accel™ Gene Delivery Device, який виготовляє Agriscetus, Inc. Middleton WI. Альтернативно, "гола" ДНК може бути перенесена через шкіру в кровоносне русло простим нанесенням ДНК на шкіру за допомогою хімічного або механічного подразнення (див. Howell et al., *WO* 95/05853).

В наступному варіанті, вектори, які кодують імуноглобуліни, можуть бути введені в клітини *ex vivo*, такі як клітини, взяті у конкретного пацієнта (наприклад, лімфоцити, пунктат кісткового мозку, біопсія тканини), або універсальні донорські кровотворні стовбурові клітини, після чого відбувається реімплантація цих клітин в організм пацієнта, як правило, після відбору клітин, в які було вбудовано вектор.

II. Профілактичні і терапевтичні методи

Даний винахід спрямований *inter alia* на лікування хвороби Альцгеймера та інших амілоїдогенних захворювань шляхом застосування терапевтичних імунологічних препаратів (наприклад, гуманізованих імуноглобулінів) до специфічних епітопів Aβ пацієнта за умови, що вони викликають сприятливу терапевтичну реакцію у пацієнта (наприклад, індукують фагоцитоз Aβ, зменшують накопичення бляшок, зумовлюють гальмування утворення бляшок, зменшення невритичної дистрофії, покращення когнітивної функції і/або

призводять до зворотного розвитку симптомів, лікування або профілактики когнітивних розладів) у пацієнта, наприклад, для профілактики або лікування амілоїдогенної хвороби. Винахід також спрямований на використання відкритих імунологічних препаратів (наприклад, гуманізованих імуноглобулінів) у виробництві медикаментів для лікування або профілактики амілоїдогенної хвороби.

В одному аспекті, винахід представляє методи профілактики або лікування захворювання, пов'язаного з відкладанням амілоїду Аβ в мозку пацієнта. Такі захворювання включають хворобу Альцгеймера, синдром Дауна та інші когнітивні ушкодження. Останнє може супроводжуватись або ні іншими властивостями амілоїдогенного захворювання. Деякі методи винаходу забезпечують застосування ефективних доз антитіла, яке специфічно зв'язує компонент амілоїдних відкладень у пацієнта. Такі методи особливо корисні для профілактики або лікування хвороби Альцгеймера у людей. Типові методи забезпечують застосування ефективної дози антитіла, яке специфічно зв'язується з Аβ. Ці методи забезпечують застосування ефективної дози антитіла, яке специфічно зв'язується з епітопом в межах 1-10 залишків Аβ, наприклад, антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 1-3 залишків Аβ, антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 1-4 залишків Аβ, антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 1-5 залишків Аβ, антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 1-6 залишків Аβ, антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 1-7 залишків Аβ, або антитіл, які специфічно зв'язуються з епітопом в межах 3-7 залишків Аβ. Ще в іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл, які зв'язуються з епітопом, який включає вільний N-кінцевий залишок Аβ. Ще в іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл, які зв'язуються з епітопом в межах 1-10 залишків Аβ, де залишок 1 і/або залишок 7 Аβ - аспарагінова кислота. Ще в іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл, які специфічно зв'язуються Аβ пептидом без зв'язування з непроцесованим білком-попередником амілоїду (APP). Ще в іншому аспекті, ізотип антитіла є IgG1 людини.

Ще в іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл, які зв'язують амілоїдні відкладення у пацієнта і індукують "очищуючу" реакцію проти амілоїдних відкладень. Наприклад, на таку "очищуючу" реакцію може впливати Fc рецептор, який є посередником фагоцитозу.

Терапевтичні засоби винаходу у типовому випадку, як правило, достатньо очищені від небажаних забруднювачів. Це значить, що ступінь гомогенності препарату становить, як правило, принаймні, біля 50% в/в (вага/вага), крім того, він є практично вільним від домішок білкової природи і забруднювачів. Інколи ступінь гомогенності препарату становить, принаймні, біля 80% в/в і, краще, принаймні, 90 або біля 95% в/в. Однак, використання традиційних методів очистки білка дає змогу отримати пептиди, ступінь гомогенності яких становить, принаймні, 99% в/в.

Методи можуть бути застосовані як до асимптоматичних пацієнтів, так і до пацієнтів, у яких в даних час спостерігаються симптоми захворювання. Антитіла, які використовуються в цих методах, можуть включати антитіла людини, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, або антитіла, що не належать людині, або їх фрагменти (наприклад, антигензв'язуючі фрагменти), антитіла можуть бути моноклональні або поліклональні, як тут описано. Ще в іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл, які утворюються в людині, імунізованій Аβ пептидом, людина може бути пацієнтом, якого можна лікувати за допомогою антитіл.

В іншому аспекті, винахід представляє застосування антитіл з фармацевтичним носієм як фармацевтичну композицію. Альтернативно, антитіло може бути застосоване шляхом введення пацієнту полінуклеотиду, який кодує, щонайменше, один ланцюг антитіла. Полінуклеотид експресується, для того щоб продукувати ланцюги антитіла в організмі пацієнта. Полінуклеотид може кодувати як важкий, так і легкий ланцюги антитіла. Полінуклеотид експресується для того, щоб продукувати важкий і легкий ланцюги антитіла в організмі пацієнта. В типових втіленнях, ведеться спостереження за рівнем введенного антитіла в крові пацієнта.

Таким чином, винахід задовільняє давню потребу з терапевтичних режимах для профілактики або покращення невропатології і, у деяких пацієнтів, когнітивних розладів, пов'язаних з хворобою Альцгеймера.

А. Пацієнти, які потребують лікування

Пацієнти, які потребують лікування, включають осіб з групи ризику, але без проявів хвороби, а також пацієнтів, у яких є симптоми хвороби в даний час. У випадку хвороби Альцгеймера, по суті, існує ризик того, що кожен може захворіти на хворобу Альцгеймера, якщо він або вона прожили досить довго. Відповідно, дані методи можуть бути застосовані профілактично до всіх людей без необхідності будь-якої оцінки ризику виникнення захворювання у пацієнта, до якого застосоване це лікування. Дані методи особливо корисні для осіб, у яких існує генетично детермінована схильність до хвороби Альцгеймера. До таких осіб належать ті, хто мають родичів, які мають це захворювання, а також ті, для кого ймовірність виникнення захворювання була встановлена за допомогою генетичних або біохімічних маркерів. Генетичні маркери ризику розвитку хвороби Альцгеймера включають мутації гена APP, особливо мутації в положенні 717, положенні 670 і 671, названі як Hardy і Swedish мутації, відповідно (див. Hardy, supra). Іншими маркерами ризику є мутації в пресеніліні генах, PS1 і PS2, ApoE4, сімейна обтяженість хворобою Альцгеймера, гіперхолестеринемія або атеросклероз. Особи, які наразі потерпають від хвороби Альцгеймера, можуть бути розпізнані за характерними проявами деменції, а також за наявністю факторів ризику, зазначених вище. Крім того, наявна ціла низка тестів для визначення осіб, які мають хворобу Альцгеймера. Ці тести включають визначення CSF тау (фактор, який стимулює колонії, КСФ) і рівня Аβ42. Підвищені значення тау і зниження рівня Аβ 42 свідчить про наявність хвороби Альцгеймера. Особи, що потерпають від хвороби Альцгеймера можуть також бути діагностовані за допомогою ADRDA критеріїв, як обговорюється в розділі Приклади.

Лікування асимптоматичних пацієнтів можна розпочинати у будь-якому віці (наприклад, 10, 20, 30). Однак, як правило, не обов'язково розпочинати лікування до того часу, поки пацієнт досягне 40, 50, 60 або 70. Лікування у типовому випадку полягає в багаторазовому введенні дози протягом певного періоду часу.

Можна проводити моніторинг лікування, аналізуючи рівень антитіл протягом певного часу. Якщо сприйнятливість [реакція] падає, призначають бустер-дозу. У випадку пацієнтів з потенційним синдромом Дауна, лікування може розпочинатись пренатально, шляхом введення терапевтичного засобу матері, або ж одразу після народження дитини.

В. Режими лікування і дозування

При профілактичному застосуванні фармацевтичні композиції або медикаменти вводяться пацієнту, сприйнятливому до хвороби Альцгеймера, або з ризиком її виникнення, в кількостях, достатніх для того щоб елімінувати або зменшити ризик, зменшити серйозність або затримати початок хвороби, включаючи біохімічні, гістологічні симптоми хвороби і/або зміни в поведінці, що характеризують цю хворобу, її ускладнення, проміжні патологічні фенотипи, що виявляються протягом розвитку хвороби. В терапевтичних застосуваннях, композиції або медикаменти вводяться хворому пацієнту або такому, стосовно якого існує підозра, що він захворіє, в кількостях, достатніх для лікування, або, принаймні, часткового гальмування симптомів хвороби (біохімічних, гістологічних і/або відхилень в поведінці), включаючи її ускладнення і проміжні патологічні фенотипи в розвитку хвороби.

В деяких методах застосування засобу зменшує або елімінує міокогнітивні ушкодження у пацієнтів, у яких ще не розвинулись ознаки патології альцгеймерівського типу. Кількість, адекватна для того, щоб здійснювати терапевтичне або профілактичне лікування, визначаються як терапевтично- або профілактично ефективна доза. Як в профілактичному, так і в терапевтичному режимах, засоби, як правило, вводяться в кількох дозах, до того часу, доки не буде отримано достатню імунну відповідь. Термін "імунна відповідь" або "імунологічна відповідь" включає розвиток гуморальної (антитіло-опосередкованої) і/або клітинної (опосередкованої антиген-специфічними Т-клітинами або продуктами їх секреції) відповіді, спрямованої проти антигена у реципієнта. Така відповідь може бути активною відповіддю, наприклад, індукованою шляхом застосування імуногену, або пасивною відповіддю, наприклад, індукованою шляхом застосування імуноглобуліну або антитіла, або примованих Т-клітин. У типовому випадку здійснюється моніторинг імунної відповіді, і повторні дози вводяться, якщо імунна відповідь починає зменшуватись.

Ефективні дози композиції даного винаходу для лікування вищезгаданих станів значною мірою варіюють і залежать від багатьох чинників, включаючи спосіб застосування, сайти-мішені, фізіологічний стан пацієнта, від того, хто є пацієнтом - людина чи тварина, від прийому інших ліків, а також від того, профілактичне це лікування, чи терапевтичне. Як правило, пацієнтом є людина, однак інші, крім людини, ссавці, включаючи трансгенних свавців, теж можуть приймати лікування. Лікувальні дози повинні бути протитровані, для того щоб забезпечити безпечність та ефективність.

Для пасивної імунізації антитілом, інтервал доз варіює від, приблизно, 0.0001 до 100мг/кг, частіше від 0.01 до 5мг/кг (наприклад, 0.02мг/кг, 0.25мг/кг, 0.5мг/кг, 0.75мг/кг, 1мг/кг, 2мг/кг, тощо) ваги тіла господаря. Наприклад, доза може становити 1мг/кг ваги тіла або 10мг/кг ваги тіла або в межах інтервалу 1-10мг/кг, переважно, щонайменше, 1мг/кг. Проміжні дози в межах вищезазначеного інтервалу також будуть розглянуті в рамках даного винаходу. Такі дози можуть вводитись суб'єктам щоденно, через день, щотижня або відповідно до будь-якої іншої схеми, визначеної емпірично. Типово, при лікуванні призначають застосування багаторазових доз протягом тривалого періоду, наприклад, протягом, принаймні, шести місяців. Додатково до режиму типового лікування призначають застосування один раз на кожні два тижні або один раз на місяць, або один раз на кожні 3-6 місяців. Типова схема дозування включає 1-10мг/кг або 15мг/кг, коли препарат вводиться щодня, 30мг/кг - через день або 60мг/кг - щотижня. В деяких методах два або більше моноклональних антитіл з різною зв'язуючою ефективністю вводяться одночасно, в випадку чого доза кожного антитіла, яке вводиться, знижується в зазначених межах.

Антитіло, як правило, застосовується багаторазово. Інтервал між окремими дозами може становити тиждень, місяць або рік. Інтервал може також бути нерегулярним і визначається шляхом вимірювання рівнів антитіла до Аβ в крові пацієнта. В деяких методах, доза підганяється, для того щоб досягти концентрації антитіла в плазмі 1-1000мг/мл і, в деяких методах, 25-300мг/мл. Альтернативно, антитіло може бути застосоване у вигляді композиції, яка підтримує секрецію, в цьому випадку потрібно рідше застосування препарату. Дозування і частота варіюють в широких межах залежно від часу напіврозпаду антитіла в організмі пацієнта. Загалом, гуманізовані антитіла виявляють найдовший час напіврозпаду, за ними йдуть химерні антитіла і антитіла, що не належать людині.

Дозування і частота застосування можуть варіювати в широких межах залежно від того, терапевтичне це лікування чи профілактичне. У випадку профілактичного застосування, композиції, які містять дані антитіла або їх суміш, вводяться пацієнту до виникнення хворобливого стану, для того щоб збільшити резистентність пацієнта. Така кількість визначається як "профілактична ефективна доза." В цьому використанні, точні кількості знову ж залежать від стану здоров'я і загального імунітету, але, звичайно, вони варіюють в межах від 0.1 до 25мг на дозу, особливо, від 0.5 до 2.5мг на дозу. Відносно низькі дози застосовуються з відносно нечастими інтервалами протягом значного періоду часу. Деякі пацієнти продовжують отримувати лікування до кінця свого життя.

При терапевтичному застосуванні, відносно високі дози (наприклад, від приблизно 1 до 200мг антитіл на дозу, здебільшого використовується дозування від 5 до 25мг) при відносно коротких інтервалах інколи потрібні до тих пір, поки розвиток хвороби послаблюється або зупиняється, бажано до тих пір, поки пацієнт виявить повне або часткове зникнення симптомів хвороби. Після цього, препарат може бути застосований в профілактичному режимі.

Дози нуклеїнових кислот, які кодують антитіла, варіюють від приблизно 10нг до 1г, 100нг до 100мг, 1нг до 10мг, або 30-300мг ДНК на пацієнта. Дози для інфікуючих вірусних векторів варіюють від 10-100, або більше, віріонів на дозу.

Терапевтичні засоби можуть бути застосовані парентерально, топічно, внутрішньовенно, орально, підшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочерепно, внутрішньоочеревинно, внутрішньоозально або внутрішньом'язово для профілактичного і/або терапевтичного лікування. Найбільш типовим способом застосування імуногенного засобу є підшкірне введення, хоча інші способи теж можуть бути однаково ефективними. Наступний найбільш поширений спосіб - внутрішньом'язова ін'єкція. Цей тип ін'єкції найчастіше здійснюється в м'язи руки або ноги. В деяких методах, засіб вводиться шляхом ін'єкції безпосередньо в конкретну тканину, де відкладення акумулюються, наприклад, за допомогою внутрішньочерепної ін'єкції. Внутрішньом'язова ін'єкція або внутрішньовенна інфузія найбільш бажані способи для застосування антитіла.

В деяких методах, конкретні терапевтичні антитіла вводяться шляхом ін'єкції безпосередньо в череп. В деяких методах, антитіла застосовуються у вигляді композицій або пристороїв, які підтримують секрецію, таких як пристрій Medipad™.

Засоби винаходу можуть на вибір застосовуватись у поєднанні з іншими засобами, які є, принаймні частково, ефективними при лікуванні амілоїдогенної хвороби. У випадку хвороби Альцгеймера або синдрому Дауна, в якому амілоїд відкладається в мозку, засіб винаходу може також бути застосований у поєднанні з іншими засобами, що збільшує перехід засобу винаходу через гематоенцефалічний бар'єр. Засоби винаходу також можуть бути застосовані у поєднанні з іншими засобами, що збільшує доступ терапевтичного засобу до клітини-мішені або тканин, наприклад, ліпосом тощо. Одночасне застосування таких засобів може зменшити дозу терапевтичного засобу (наприклад, терапевтичного антитіла або ланцюга антитіла), потрібну для досягнення бажаного ефекту.

С. Фармацевтичні композиції.

Засоби винаходу часто застосовуються як фармацевтичні композиції, що включають активний терапевтичний агент, наприклад, та інші фармацевтично прийнятні компоненти. Див. Remington's Pharmaceutical Science 30 (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). Форма, якій надається перевага, залежить від способу введення і терапевтичного застосування. Композиції можуть також включати, залежно від бажаної композиції препарату, фармацевтично прийнятні, нетоксичні носії або розчинники, які визначаються як наповнювачі, що звичайно використовуються при створенні фармацевтичної композиції для введення людині або тварині. Розчинник добирається таким чином, щоб він не впливав на біологічну активність комбінації. Прикладами розчинників є дистильована вода, фізіологічний фосфатно-буферний розчин, розчини Рінгера, розчин декстрази і розчин Хенкса. Крім того, фармацевтичні композиції можуть також включати інші носії, ад'юванти або нетоксичні, нетерапевтичні, неімунотоксичні стабілізатори тощо.

Фармацевтичні композиції можуть також включати великі молекули, які повільно перетворюються в процесі метаболізму, такі як білки, полісахариди, такі як хітозан, полілактатні кислоти, полігліколеві кислоти і кополімери (такі як латекс на основі сефарози (ТМ), агароза, целюлоза тощо), полімерні амінокислоти, кополімери амінокислот, ліпідні агрегати (такі як краплини олії або ліпосоми). Крім того, ці носії можуть функціонувати як імуностимулюючі засоби (наприклад, ад'юванти).

Для парентерального введення засоби винаходу можуть бути застосовані як дози розчину або суспензії речовини в фізіологічно прийнятному розчиннику з фармацевтичним носієм, яким може бути стерильна рідина, така як вода, олія, сольовий розчин, гліцерол або етанол, які можуть бути введені шляхом ін'єкції. Крім того, допоміжні речовини, такі як змочуючі або емульгуючі засоби, сурфактанти, рН-буферні речовини тощо можуть бути присутні в композиції. Іншими компонентами фармацевтичних композицій є похідні нафти, речовини тваринного, рослинного або синтетичного походження, наприклад, арахісова олія, соєва олія, мінеральні олії. Загалом, гліколям, таким як пропіленгліколю або поліетиленгліколю віддається перевага як рідинам-носіям, особливо для приготування розчинів, які вводяться шляхом ін'єкції. Антитіла можуть бути введені у вигляді депо ін'єкції або імплантаційного препарату, які можуть бути складені таким чином, щоб забезпечити тривалу секрецію активного інгредієнта. Типова композиція включає моноклонального антитіла 5мг/мл, складена у водному буфері, який містить 50мМ L-гістидину, 150мМ NaCl, доведеному до рН6.0 за допомогою HCl.

Типово, композиції готуються так, щоб їх можна було вводити шляхом ін'єкції, або як рідкі розчини чи суспензії; тверді форми, придатні для розчинення або суспендування, рідкі наповнювачі перед ін'єкцією також можуть бути приготовлені. Препарат також може бути емульгований або інкапсульований в ліпосомах або мікрогранулах з полілактидів, полігліколідів або кополімерів для посилюючого ад'ювантного впливу, як обговорювалось вище (див. Langer, Science 249: 1527(1990) and Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97 (1997)). Засоби цього винаходу, введені у вигляді депо ін'єкції або імплантаційного препарату, можуть бути складені таким чином, щоб забезпечити тривалу секрецію активного інгредієнта або пульсуючу секрецію активного інгредієнта.

Додаткові композиції, придатні для застосування в інший спосіб, включають оральний, інтраназальний, легеневі композиції, супозиторії і трансдермальні аплікації. Для супозиторіїв зв'язуючі матеріали і носії включають, наприклад, поліалкіленгліколь або тригліцериди; такі супозиторії можуть бути сформовані із суміші, яка містить активні інгредієнти в межах від 0.5% до 10%, переважно 1%-2%. Оральні композиції включають наповнювачі, такі як фармацевтичні форми маннітолу, лактози, крохмалю, магнію стеарат, сахарин натрію, целюлоза і магнію карбонат. Ці композиції мають вигляд розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, капсул, композицій з повільною секрецією або порошоків і містять 10%-95% активного інгредієнта, переважно 25%-70%.

Топічне застосування може забезпечити трансдермальну або внутрішньошкірну доставку препарату. Топічне застосування може бути полегшене за рахунок одночасного застосування засобу з холерним токсином або його нейтралізованими похідними сполуками або його субодиницями чи іншими подібними бактеріальними токсинами (Див. Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). Одночасного застосування можна досягти шляхом використання компонентів у вигляді суміші або як хімічно зв'язаних молекул, отриманих за допомогою перехресного зшивання або експресії злитого білка.

Альтернативно, трансдермальна доставка може бути здійснена через шкіру або за допомогою трансферосом (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25: 3521 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-15 (1998)).

III. Моніторинг курсу лікування

Винахід представляє методи моніторингу лікування пацієнта, який страждає або сприйнятливий до хвороби Альцгеймера, наприклад, для моніторингу курсу лікування, порівняти із значеннями, які раніше були отримані у пацієнта після попереднього курсу лікування. Значне зменшення порівняно з попередніми вимірюваннями (наприклад, більше ніж типове граничне значення похибки експерименту при повторних вимірюваннях) є свідченням того, що лікування можна поновити. Крім того, значення, отримане у пацієнта, можна порівняти з контрольним значенням (середнє плюс квадратичне відхилення), отриманим для групи

пацієнтів після того, як вони пройшли курс лікування. Альтернативно, виміряні значення у пацієнта можна порівняти із контрольними значеннями в групі пацієнтів, які отримали профілактичне лікування, і у яких в даний час відсутні симптоми хвороби, або в групі пацієнтів, які отримали терапевтичного лікування і які виявляють покращення характерних особливостей хвороби. У всіх цих випадках, істотне зниження відносно контрольного рівня (наприклад, більше, ніж квадратичне відхилення) є свідченням того, що лікування пацієнта слід поновити.

Як зразки тканини для аналізу беруть, як правило, кров, плазму, сироватку, мукозну рідину або цереброспінальну рідину пацієнта. Зразки досліджуються, наприклад, щодо рівнів або профілів антитіл до Аβ пептиду, наприклад, рівнів або профілів гуманізованих антитіл. ELISA методи визначення антитіл, специфічних до Аβ, наводяться в розділі Приклади. В деяких методах рівень або профіль введеного антитіла визначається за допомогою аналізу очищення, наприклад, аналізу фагоцитозу *in vitro*, як тут описано. В таких методах зразок тканини мозку досліджуваного пацієнта приводять в контакт з амілоїдними відкладеннями (наприклад, взятими у PDAPP миші) і фагоцитами, які несуть Fc-рецептори. Після цього вивчається наступне очищення амілоїдних відкладень. Існування і розмах відповіді, яка проявляється в очищенні, є показником присутності і рівня антитіл, здатних виводити Аβ із зразка тканин досліджуваного пацієнта.

Профіль антитіла після пасивної імунізації, як правило, показує негайний пік концентрації антитіла, за яким йде експоненціальний розпад. Без подальшого введення наступної дози, концентрація антитіла прагнути до рівнів, які спостерігались до лікування, протягом періоду, який вимірюється днями або місяцями, залежно від часу напіврозпаду введеного антитіла.

В інших методах, визначення початкових значень антитіла до Аβ у пацієнта виконується перед застосуванням засобу, наступне вимірювання виконується одразу ж після нього, для того щоб визначити пік рівня антитіла, через певні проміжки часу виконуються ще одне або кілька вимірювань, для того щоб простежити за падінням рівнів антитіла. Якщо рівень антитіла падає до початкового значення або до завчасно визначеної величини процентного вмісту, нижчої, ніж початкове значення (наприклад, 50%, 25% або 10%), застосовується введення наступної дози антитіла. В деяких методах, пік або послідовно виміряні рівні, нижчі фоновому рівню, порівнюються з еталонними рівнями, визначеними раніше для складання сприятливого режиму профілактичного або терапевтичного лікування у пацієнтів. Якщо вимірюваний рівень антитіла істотно нижчий, ніж еталонний рівень (наприклад, менший, ніж середнє значення мінус значення квадратичного відхилення від еталонного значення в групі пацієнтів, на яких лікування вплинуло сприятливо), показано застосування додаткової дози антитіла.

Додаткові методи включають моніторинг протягом курсу лікування, будь-якого визнаного в галузі фізіологічного симптому (наприклад, фізичного або психічного симптому), загальноприйнятого дослідниками і лікарями для діагностики або моніторингу амілоїдогенної хвороби (наприклад, хвороби Альцгеймера). Наприклад, будь-хто може спостерігати когнітивні розлади. Ці розлади є симптомом хвороби Альцгеймера і синдрому Дауна, але можуть також зустрічатись без інших характерних особливостей кожного з цих захворювань. Наприклад, моніторинг когнітивних розладів можна здійснювати за допомогою шкали дослідження психічного стану пацієнта, відповідно до домовленості, протягом всього курсу лікування.

С. Комплект реактивів.

Винахід далі представляє комплект реактивів для виконання методів моніторингу, що були описані вище. Як правило, такі комплекти включають засіб, який специфічно зв'язується з антитілами до Аβ. Цей комплект може також включати мітку. Для виявлення антитіл до Аβ, як мітку здебільшого використовують мічені антиідіотипічні антитіла. Для виявлення антитіл, засіб може бути попередньо зв'язаний з твердою фазою, такою як лунки планшету для мікротитрування. Комплект реактивів, як правило, включає також етикетку з інструкцією щодо застосування цього комплекту. Етикетка також може включати таблиці або графіки, що представляють залежність рівнів визначених міток від рівня антитіла до Аβ. Термін "етикетування" стосується будь-якого написаного або зареєстрованого матеріалу, який кріпиться до набору або у інший спосіб супроводжує набір реактивів в будь-який час протягом його виробництва, транспортування, продажу або використання. Наприклад, термін "етикетування" включає в себе рекламні листівки або брошури, пакувальні матеріали, інструкції, аудіо- або відеокасети, комп'ютерні диски, а також написи, надруковані безпосередньо на комплектах.

Винахід представляє також діагностичні комплекти реактивів, наприклад, для досліджень, дослідні і/або діагностичні кити (наприклад, для виконання візуалізації *in vivo*). Такі кити, здебільшого, включають антитіло для зв'язування з епітопом Аβ, переважно в межах залишків 1-10. Переважно, антитіло мітиться або вторинно мічений реактив включається в кит. Переважно, кит супроводжується інструкцією з використання, наприклад, для виконання візуалізації *in vivo*. Типові антитіла описуються тут.

D. Візуалізація *In vivo*

Винахід представляє методи візуалізації *in vivo* амілоїдних відкладень у пацієнта. Такі методи використовують для діагностики або підтвердження діагнозу хвороби Альцгеймера або сприйнятливості до неї. Наприклад, методи можуть бути використані на пацієнтах з симптомами деменції. Якщо пацієнт має патологічні амілоїдні відкладення, тоді цей пацієнт, очевидно, потерпає від хвороби Альцгеймера. Ці методи можуть бути також застосовані до асимптоматичних пацієнтів. Наявність патологічних відкладень амілоїду свідчить про сприйнятливості в майбутньому до симптоматичної хвороби. Ці методи можуть бути використані для моніторингу прогресування хвороби і/або відповіді на лікування у пацієнтів, яким було раніше поставлено діагноз хвороба Альцгеймера.

Ці методи працюють шляхом введення засобу, такого як антитіло, що зв'язується з Аβ, пацієнту, а далі виявлення засобу після цього зв'язування. Антитіла винаходу зв'язуються з Аβ відкладеннями у пацієнта без зв'язування з непроцесованим APP поліпептидом. Особлива перевага надається антитілам, що зв'язуються з епітопом Аβ в межах амінокислот 1-10. В деяких методах, антитіло зв'язується з епітопом Аβ в межах амінокислот 7-10 Аβ. Такі антитіла, як правило, зв'язуються без індукування істотної відповіді очищення. В інших методах, антитіло зв'язується з епітопом Аβ в межах амінокислот 1-7 Аβ. Такі антитіла, здебільшого,

зв'язують і індукують виведення Аβ. Однак, реакції виведення можна уникнути, якщо використовувати фрагменти антитіла, в яких відсутня непроцесована константна область, така як Fab. В деяких методах, те ж саме антитіло може слугувати як терапевтичним, так і діагностичним засобом. Загалом, антитіла, які зв'язуються з епітопами С-кінцевої ділянки через 10 залишок Аβ, не виявляють такого сильного сигналу, як антитіла, які зв'язуються з епітопами в межах 1-10 залишків, згодом, тому що епітопи С-кінцевої області недосяжні в амілоїдних відкладеннях. Відповідно, таким антитілам надається менша перевага.

Діагностичні засоби можуть застосовуватись шляхом внутрішньовенної ін'єкції в тіло пацієнта або безпосередньо в мозок шляхом внутрішньочерепної ін'єкції, або через отвір в черепі, зроблений за допомогою дреля. Доза засобу має знаходитись в тих же межах, що й для лікувальних методів. Здебільшого, засіб мітиться, хоча в деяких методах, первинний засіб із спорідненістю до Аβ не мітиться, а використовується вторинно мічений засіб для зв'язування первинного засобу. Вибір мітки залежить від способу виявлення. Наприклад, флуоресцентна мітка прийнятна для оптичного виявлення. Використання парамагнітних міток, прийнятне для томографічного виявлення без хірургічного втручання. Радіоактивні мітки можуть бути виявлені за допомогою позитронно-емісійної томографії (PET) або однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (SPECT).

Діагноз ставиться на основі порівняння кількості, розміру, і/або інтенсивності мічених локусів у порівнянні з початковими значеннями. Початкові значення можуть представляти середній рівень в популяції здорових осіб. Початкові значення можуть представляти попередній рівень, визначений у того ж самого пацієнта. Наприклад, початкові значення можуть бути визначені у пацієнта перед початком лікування, а отримані значення після цього порівнюються з початковими значеннями. Зменшення значень по відношенню до початкових свідчить про позитивну відповідь на лікування.

Даний винахід більш повно буде описаний наступними необмеженими прикладами.

Приклади

Наступні послідовності ідентифікації використовуються всюди в розділі Приклади при посиланні на амінокислотні і нуклеотидні послідовності варіабельної області ланцюга імуноглобуліну.

Антитіло	<u>VL</u> <u>нуклеотидна</u> <u>послідовність</u>	<u>VL</u> <u>амінокислотна</u> <u>послідовність</u>	<u>VH</u> <u>нуклеотидна</u> <u>послідовність</u>	<u>VH</u> <u>амінокислотна</u> <u>послідовність</u>
12B4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
гуманізована не 12B4v1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
гуманізована не 12B4v2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
гуманізована не 12B4v3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
гаметна A19	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30		
Kabat ID 005036	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32		
Kabat ID 000333			SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
гаметна VH4-61			SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
гаметна VH4-39			SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38

Як тут використовується, послідовність антитіла або імуноглобуліну, яка включає VL і/або VH послідовність, позначається далі як SEQ ID NOs: 1-12 або 29-38 може представляти або непроцесовану послідовність, або може представляти зрілу послідовність (наприклад, зрілий пептид без сигнального або лідерного пептиду).

Приклад I. Клонування і секвенування варіабельних областей 12B4 миші

Клонування і секвенування 12B4 VH. VH і VL області 12B4 клітин гібридами були клоновані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR) і 5' RACE з використанням мПНК з клітин гібридами і стандартної Процесики клонування. Послідовність нуклеотиду (SEQ ID NO: 3) і виведена амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 4), що походять з двох незалежних кДНК клонів, які кодують передбачуваний 12B4 VH домен, представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3, відповідно.

Таблиця 2: Послідовність ДНК VH 12B4 миші.

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA
GGTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCTCAGTCTGA
CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG
CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGAGGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCTAACAATCAGG
TATTCCTCAAGATCACCAATGTGGACACTGCTGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGA
AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT
CACAGTCTCCTCAG (SEQ ID NO:3)

*Лідерний пептид підкреслений

Таблиця 3: Амінокислотна послідовність VH 12B4 миші.

mdritssfllivpayvlsqVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLStngmgvsWIR
QPSGKGLEWLahiywdeedkrynpiksRLTISKDTSNQVFLKITNVDATATYYCAR
rriydvdydyWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 4)

* Лідерна послідовність і CDR-ділянки в нижньому випадку.

Клонування і секвенування VL 12B4 . Легкий ланцюг варіабельної VL області 12B4 був клонований по аналогії з VH областю. Нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO: 1) і виведена амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:2) походять від двох незалежних кДНК клонів, які кодують передбачуваний 12B4 VL домен, представлені в Таблиці 4 і Таблиці 5, відповідно.

Таблиця 4: Послідовність ДНК VL 12B4 миші

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGA
TGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTTTCATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT
TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGA
TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTT
CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC (SEQ ID NO:1)

*Лідерний пептид підкреслений

Таблиця 5: Амінокислотна послідовність VL 12B4 миші.

mklpvrllvimfwpassssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqnvhsngntyleW
YLQKPGQSPKLLIYkysnrfsGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCfqqshv pIIFGAGTKLELK
(SEQ ID NO 2)

*Лідерний пептид і CDR-ділянки в нижньому випадку пептиду

Послідовність VL і VH 12B4 відповідає критеріям для функціональних V-ділянок остіїлки, оскільки вони включають суміжні відкриті рамки зчитування (ORF) від ініціатора метіоніну до С-ділянки, і розділяють властивості консервативних залишків генів V області імуноглобуліну. Від N-кінцевого до С-кінцевого, як легкий, так і важкий ланцюги включають домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Порівняння амінокислотних послідовностей кожного домену здійснюється у відповідності до порядку нумерації Kabat et al., supra.

Приклад II: Експресія химерного 12B4 антитіла

Експресія химерного 12B4 антитіла:

Варіабельні області важкого і легкого ланцюга були реконструйовані для того, щоб закодувати сплайсуючу

донорну послідовність у прямому напрямку до відповідних VDJ або VJ з'єднань, і клоновані в вектор експресії ссавців pCMV-hy1 для важкого ланцюга, і pCMV-hk1 для легкого ланцюга. Ці вектори кодують y1 і Ck константні ділянки людини як екзони нижче вбудованого кластера варіабельної області. Після верифікації послідовності, вектори експресії важкого ланцюга і легкого ланцюга були разом перенесені в COS клітини. Різні клони важкого ланцюга були незалежно перенесені разом з різними клонами химерного легкого ланцюга для того, щоб підтвердити відтворюваність результату. Кондиціоновані середовища були зібрані через 48 год після трансфекції і досліджені за допомогою вестерн блот аналізу на утворення антитіла або ELISA на зв'язування Аβ. Всі численні трансфектанти експресували комбінації важкий ланцюг+ легкий ланцюг, які розпізнавались козилими антитілами, спрямованими проти IgG (H+L) людини в вестерн блоті.

Пряме зв'язування химерних 12B4 антитіл з Аβ було досліджено за допомогою Процесу імуноферментного аналізу ELISA. Фіг.5 свідчить про те, що химерне 12B4 антитіло зв'язується з Аβ з високим авідитетом, подібним до того, який виявляють химерне і гуманізоване 3D6 антитіла (Фіг.5). (Клонування, специфікація і гуманізація 3D6 описується в U.S. Patent Application Serial No.10/010,942, повний зміст якого включений тут як довідкова інформація) Крім того, Процес аналізу ELISA, оснований на аналізі конкурентного гальмування, виявив, що химерне 12B4 і 12B4 антитіло миші однаковою мірою конкурують з біотинільованим мишачим і химерним 3D6, а також з 10D5 (мишаче моноклональне антитіло IgGy1 ізо типу, яке розпізнає той же епітоп, що й 12B4), за зв'язування Аβ. Фіг.6 свідчить, що химерне 12B4 (пунктирна лінія, відкриті трикутники) конкурує з однаковою ефективністю з його небіотинільованою мишачою копією (суцільна лінія, закриті трикутники) за зв'язування біотинільованого мишачого 12B4 з Аβ 1-42 пептидом.

Приклад III: Ефективність mAb 12B4 при різних невропатологічних порушеннях у PDAPP мишей

Цей приклад описує ефективність мишачого mAb 12B4 щодо різних невропатологічних порушень. Наводиться порівняння двох mAb, 12B4 і 3D6. Обидва mAb є ізо типами IgG2a, і обидва зв'язуються з епітопом в межах N-кінцевої ділянки Аβ - пептиду.

Імунізації

PDAPP миші були пасивно імунізовані або mAb 12B4 (яке розпізнає Аβ 3-7), або mAb 3D6 (яке розпізнає Аβ 1-5), обидва IgGy2a ізо типи. Досліджувана концентрація 12B4 становила 10мг/кг. 3D6 вводили в трьох різних дозах, 10мг/кг, 1мг/кг і 10кг/кг один раз на місяць (1×4). Незв'язане IgGy2a антитіло (TY11/15) та ін'єкції фізіологічного розчину з фосфатним буфером (PBS) були контролем. Для порівняння була використана активна імунізація Аβ пептидом. В кожній групі було проаналізовано від 20 до 35 тварин.

Невропатологічні порушення, які були досліджені, включали амілоїдні відкладення і невритичні відкладення.

Амілоїдні відкладення

Величина фронтального кортексу, охопленого амілоїдними відкладеннями, була визначена шляхом фарбування з використанням 3D6 як імуної мітки з наступним кількісним томографічним аналізом. Результати цього аналізу представлені в Таблиці 6. Всі види імунотерапії (наприклад, імунізація 12B4, 3D6 (всі випробувані дози) і Аβ пептидом) призвели до значного зменшення амілоїдного навантаження.

Невритичні відкладення.

Попередньо спостерігали, що для 10D5 не було притаманним значною мірою зменшувати невритичні зміни, припускаючи, що антитіла IgGy2a ізо типу, на відміну від інших ізо типів, здатні зменшувати невритичні зміни на тваринній моделі хвороби Альцгеймера (дані не представлені). Невритичні зміни після пасивної імунізації 12B4 проти 3D6 (обидва ізо типи IgGy2a) були, таким чином, визначені у PDAPP мишей шляхом фарбування зрізів мозку з використанням анти-APP антитіла 8E5 як імуної мітки з наступним кількісним томографічним аналізом. Про невритичну дистрофію свідчить поява дистрофічних невритів (наприклад, невритів з глобулярною будовою), розташованих безпосередньо біля амілоїдних бляшок. Результати цього аналізу представлені в Таблиці 7. Ці дані свідчать про те, що лікування за допомогою 12B4 більш істотно зменшувало невритичні порушення. І, навпаки, 3D6 істотно не зменшувало невритичних порушень.

Таблиця 6: Амілоїдні відкладення у фронтальному кортексі

	PBS	TY 11/15	12B4	3D6, 10 мг/кг	3D6, 1 мг/кг	3D6, 10 мг/кг/4 тижні	Актив
N	31	31	31	31	31	31	31
Середнє (%AB)	15 182297	13 303288	2.317222	0.865671	2.286513	1.470956	2.162772
Діапазон	0 160-31 561	0-61.706	0-14 642	0-7.064	0.077-63.362	0-10.688	0-30.715
p значення (**M-W)		9425 ns	*** <.0001	***.0001	*** <.0001	*** <.0001	***.0004
% Зміни	N/A	12%	85%	94%	85%	90%	86%

Таблиця 7. Неврогічне зміни фронтальної кори

	PBS	TY 11/15	12B4	3D6, 10 мг/кг	3D6, 1 мг/кг	3D6, 10 мг/кг/4 тижні	Актив
N	31	30	33	29	31	32	24
Середнє (%NR)	0.3946	0.3958	0.0816	0.4681	0.3649	0.4228	0.2344
Діапазон	0-1.3828	0-2.6800	0-0.8127	0-1.3098	0-1.5760	0-1.8215	0-1.1942
p значення (M-W)		.8987 ns	***.0002	.9587 ns	.6986 ns	>.9999	***.0381
% Зміни		0%	79%	0%	7%	0%	41%

Наведені вище результати свідчать, що лікування з використанням A β антитіла IgGy2a ізо типу може бути необхідним, але не достатнім, для того щоб зменшити невритичне навантаження. Зв'язування A β via чітко визначений епітоп (наприклад, A β 3-7) може також істотно зменшувати цю патологію у PDAPP мишей.

Визначення особливостей різних невропатологічних відхилень PDAPP модельних мишей з хворобою Альцгеймера дає цінну інформацію, яка може бути використана досвідченими фахівцями при створенні відповідного протоколу терапевтичної імунізації людини. Наприклад, зменшення невритичного навантаження може супроводжуватись у людей використанням гуманізованої версії 12B4 підтипу IgG1 (наприклад, у людини це аналог мишачого IgGv2A підтипу), які зв'язуються з епітопом в межах залишків 3-7 A β .

Приклад IV: Скринінг ex vivo активності антитіл проти амілоїдних відкладень

Для того щоб вивчити вплив антитіл на кліренс бляшок, був використаний аналіз *ex vivo*, в якому первинні мікрогліальні клітини культивували з нефіксованими, отриманими за допомогою заморожувачого мікротома, зрізами мозкової тканини людини, хворих на хворобу Альцгеймера або PDAPP мишей. Мікрогліальні клітини були отримані з церебральної кори новонароджених DBA/2N мишей (1-3 днів). Кортикальний шар був механічно подрібнений в збалансованому сольовому розчині Хенкса (HBSS– Sigma), який містить 50µг/мл дезоксирибонуклеази I (ДНК-аза I, Sigma). Дисцийовані клітини були відфільтровані за допомогою клітинного сита (Falcon) з діаметром пор 100µм і центрифуговані при 1000об/хв протягом 5 хвилин. Осад був ресуспендований в ростовому середовищі Ігла в модифікації Дульбекко з високим вмістом глюкози (DMEM), 10% фізіологічному розчині з фосфатним буфером (FBS), 25нг/мл рекомбінантної мишачої GM-CSF (PmGM-CSF), потім клітини були нанесені на середовище із щільністю 2 мозки на T-75 пластикову колбу для культивування. Через 7-9 днів, колби обертати на орбітальному шейкері при 200об/хв протягом 2 год і температури 37°C. Клітинну суспензію центрифугували при 1000об/хв і ресуспендували в дослідному середовищі.

Зрізи мозку PDAPP мишей або людей з хворобою Альцгеймера, завтовшки 10 μm , отримані на заморозуючому мікромомі (час після настання смерті <3 год), були розморожені і нанесені на покриті полілізином покривні скельця і поміщені в 24-луночні планшети для культури тканин. Покривці скельця двічі промивали досліджуванним середовищем, яке містить H-SFM (Hybridoma-serum free medium, Gibco BRL) з 1% фізіологічним розчином з фосфатним буфером (FBS), глютаміном, пеніциліном/стрептоміцином, і 5нг/мл rGM-CSF (R&D). Контрольні або анти- $\text{A}\beta$ антитіла (12B4) додавали в концентрації $2\times$ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ остаточна) протягом 1 години. Після цього мікрогліальні клітини були висіяні із щільністю 0.8×10^6 клітин/мл досліджуваного середовища. Культури підтримували у вологій камері (37°C, 5% CO_2) протягом 24 годин і більше. Наприкінці інкубації культури фіксували 4% параформальдегідом і просочували 0.1% тритоном-X100. Зрізи фарбували біотинільованим 3D6, а потім кон'югували стрептавідином/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Екзогенні мікрогліальні клітини були візуалізовані за допомогою флуорохрому для ядер (DAPI). Культури вивчали за допомогою інвертуючого флуоресцентного мікроскопа (Nikon, TE300), мікрофотографії були зроблені за допомогою цифрового фотоапарата SPOT з використанням програмного забезпечення SPOT (Діагностичні прилади).

Якщо скринінг проводили із зрізами мозку PDAPP мишей в присутності контрольного антитіла, яке неактивне *in vivo*, β -амілоїдні бляшки залишались інтактними і жодних ознак фагоцитозу не було виявлено. І, навпаки, якщо прилеглі зрізи культивували за наявності 3D6 або 12B4, амілоїдні відкладення значною мірою були виведені і мікрогліальні клітини включали численні фагоцитарні пухирці, які містять A β (Фіг.7). Подібні результати були отримані на зрізах мозку хворих на хворобу Альцгеймера; 3D6 (гуманізована версія) і химерне 12B4 індукувало фагоцитоз A β бляшок, тоді як контрольне IgG1 було неефективне (Фіг.8A-B).

Дані, наведені в Прикладі II і III, підтверджують функції клонованих варіабельних областей 12B4.

Прикладу V. Гуманізація 12B4

A. 12B4 Гуманізоване антитіло. Версія 1

Гомологія/Молекулярне моделювання. Для того щоб ідентифікувати основні структурні каркасні залишки в мишачому 12B4 антитілі, була створена тримірна модель важкого і легкого ланцюгів, відштовхуючись від найбільш подібних мишачих антитіл для важкого і легкого ланцюгів. З цією метою антитіло, позначене як 2PCP, було обрано як матриця для моделювання легкого ланцюга 12B4 (PDB ID: 2PCP, Lim et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 28576), і антитіло, позначене як 1ETZ, було обрано як матриця для моделювання важкого ланцюга (PDB ID: 1ETZ, Guddat et al. (2000) J. Mol. Biol. 302: 853). Порівняння амінокислотної послідовності 12B4, а також легкого ланцюга і важкого ланцюга цих антитіл показало, що 2PCP і 1ETZ антитіла виявляють істотну гомологію послідовності з 12B4. Крім того, петлі CDR відібраних антитіл потрапляють в ті ж самі канонічні структурні класи Chothia, що й CDR петлі 12B4. Відповідно, 2PCP і 1ETZ були початково відібрані як антитіла з відомою структурою для моделювання гомології 12B4.

Перша версія моделі гомології варіабельної області 12B4, основана на вищезгаданих антитілах, була сконструйована з використанням пакету програмного забезпечення Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5). Це програмне забезпечення було придбано на основі довічної ліцензії від Molecular Applications Group (Пало Альто, штат Каліфорнія). Цей пакет програмного забезпечення, розроблений докторами Michael Levitt і Chris Lee, полегшує процес молекулярного моделювання за рахунок автоматизації етапів структурного моделювання первинної послідовності на матриці відомої структури, базуючись на гомології послідовності. Опрацьована за допомогою робочої станції типу Silicon Graphics IRIS у середовищі UNIX, змодельована структура автоматично вдосконалюється шляхом серії етапів мінімізації енергії для того, щоб уникнути несприятливих атомарних контактів, а також оптимізувати взаємодію електростатичних сил та сил Ван дер Ваальса. Наступна вдосконалена модель була побудована з використанням моделюючих можливостей Quanta®.

Відбір акцепторної послідовності антитіла людини. Придатні акцепторні послідовності антитіла людини були визначені шляхом комп'ютерних порівнянь амінокислотних послідовностей мишачих варіабельних областей з послідовностями відомих антитіл людини. Порівняння було виконано окремо для важкого і легкого ланцюгів 12B4. Зокрема, варіабельні домени антитіл людини, каркасні послідовності яких виявляли високий ступінь ідентичності послідовностям каркасних ділянок мишачих VL і VH, були визначені шляхом запиту бази даних Kabat, використовуючи NCBI BLAST (яка доступна для широкого загалу через інтернет сервер Національних Інститутів Здоров'я Національного Центру Біотехнологічної Інформації, NCBI) з відповідними каркасними послідовностями миші.

Дві послідовності-кандидати були відібрані як акцепторні послідовності, виходячи з наступних критеріїв: (1) гомологія з послідовністю суб'єкта; (2) спільність канонічних CDR структур з донорною послідовністю; і (3) вони не повинні включати будь-яких унікальних залишків в каркасних областях. Відібрана акцепторна послідовність для VL є Kabat ID Number (KABID) 005036 (Genbank Accession No.X67904), і для VH є KABID 000333 (Genbank Accession No.X54437). В перших версіях гуманізованого 12B4 антитіла були використані саме ці відібрані послідовності акцепторного антитіла.

Заміна амінокислотних залишків. Як зазначено *supra*, гуманізовані антитіла винаходу, які включають каркасні ділянки варіабельної області, головним чином, з імуноглобуліну людини (акцепторного імуноглобуліну) і ділянок, що визначають комплементарність до антигена, головним чином, з мишачого імуноглобуліну (донорного імуноглобуліну), названі 12B4. При наявності визначених областей, що визначають комплементарність, у 12B4, і відповідного акцепторних імуноглобулінів людини, наступним кроком було визначити, який, якщо будь-який, залишок з цих компонентів можна замінити, для того щоб оптимізувати властивості отриманого в результаті гуманізованого антитіла.

Реконструйована V область легкого ланцюга:

Амінокислотне вирівнювання реконструйованої V-області легкого ланцюга представлено на Фіг.1. Акцепторна каркасна частина (Kabat 005036) була обрана з тієї ж підгрупи людини, що й та, яка відповідає V-області миші, не має унікальних каркасних залишків, а CDR-ділянки належать до однієї Chothia канонічної структурної групи. Єдина зворотна мутація (I2V) необхідна, тому що цей залишок потрапляє в канонічну класифікацію. Версія 1 реконструйованого VL повністю гаметна.

Реконструйована V область важкого ланцюга:

Амінокислотне вирівнювання реконструйованої V-області важкого ланцюга представлено на Фіг.2. Акцепторна каркасна частина (Kabat 000333) була обрана з тієї ж підгрупи людини, що й та, яка відповідає V-області миші, не має унікальних каркасних залишків, а CDR-ділянки належать до однієї Chothia канонічної структурної групи. Моделювання структури мишачого VH ланцюга, у поєднанні з амінокислотним вирівнюванням Kabat 000333 з мишачою послідовністю потребує 9 зворотних мутацій в версії 1 (в1) реконструйованого важкого ланцюга L2V, V24F, G27F, I29L, I48L, G49A, V67L, V71K, & F78V (Kabat нумерація). Зворотні мутації відмічені зірочками у амінокислотному вирівнюванні, представленому на Фіг.2.

Серед 9 зворотних мутацій, 4 були визначені моделлю, тому що ці залишки - це канонічні залишки (V24F, G27F, I29L, & V71K, показані як суцільно зафарбовані блоки), наприклад, каркасні залишки, які можуть обумовлювати зв'язування антигена в міру наближення до CDR залишків. Не існує зворотних мутацій, потрібних в наступному найбільш важливому класі залишків, залишків, які беруть участь в утворенні пакувальної взаємодії VH-VL (позначено відкритими блоками). Решта 5 залишків, призначених для зворотної мутації (L2V, I48L, G49A, V67L, F78V, Kabat нумерація) потрапляють до класу Верньє (опосередкований вклад в конформацію CDR, густо обнесені точками блоки на Фіг.2).

Версія 2 була створена для того, щоб зберегти найменше число не-CDR мишачих залишків. Зворотна мутація L2V вводить зміну, що не має гаметного походження (при використанні VH4-61 як еталонної гаметної лінії), ця зворотна мутація елімінується в Версії 2 важкого ланцюга, для того щоб відновити її в гаметній лінії. Інші 4 зворотні мутації Верньє класу також зберігають в Версії 2 важкого ланцюга (I48L, G49A, V67L, F78V). Таким чином, Версія 2 включає загалом 5 не-CDR мишачих залишків (1 в VL, і 4 в VH). Версія 3 була створена для того, щоб зберегти 2 з 5 залишків Верньє (I48L, & F78V), які, як показує модель, можуть бути найбільш важливими серед залишків Верньє. Відповідно, Версія 3 включає загалом 7 не-CDR мишачих залишків.

Резюме змін, введених в Версіях 1, 2 і 3 гуманізованого 12B4, представлено в Таблиці 8.

Таблиця 8

Резюме змін в гуманізованому 12B4. v1

Зміни	VL(111 залишків)	VH (123 залишки)
Гу>Ми: Каркас	1/111	9/123
CDR1	8/16	7/7
CDR2	3/7	8/16
CDR3	6/8	10/13
Загалом Гу->Ми	18/111(16%)	34/123 (28%, в2=23%)
Ми->Гу: Каркас	10/111	16/123
Зворотна мутація (примітка)	1. 12 V: канонічне положення	2. Канонічні: V24F, G27F, I29L, & V71K
		3. Упаковка: відсутня. 4. Верньє: L2V*, I48L#, G49A*, V67L*, F78V#
Акцепторна частина (примітки)	5. KABID 005036/Genbank Acc#-x67804 6. CDR-ділянки з тієї ж самої канонічної структурної групи, що й донорні мишачі; 7. анти-кардіоліпін/ одноланцюгова ДНК - автоантитіла від хворих на системний червоний вовчак(SLE);	8. KABID000333/Genbank Acc#x54437 9. CDR-ділянки з тієї ж самої канонічної структурної групи, що й донорні мишачі; 10. ревматоїдний фактор mAb від хворих на ревматоїдний артрит (RA)

* елімінують в в2 і в3;

* елімінують в в2, зберігають в в3.

Таблиці 9 і 10 включають ключі Kabat-нумерації для різних важких і легких ланцюгів, відповідно.

Таблиця 9: Ключ до Kabat нумерації легкого ланцюга

<u>KAB</u> #	# ТИП	<u>миша</u> <u>12B4</u> <u>VL</u>	<u>ГУМ</u> <u>12B4</u> <u>VL</u>	<u>KABI</u> <u>D</u> <u>00503</u> <u>6</u>	A19; гаметна лінія	Примітки
1	1 FR1	D	D	D	D	
2	2	V	V	I	I	канонічний – зворотна мутація в v1, s2 і v3
3	3	L	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	S	S	S	S	
11	11	L	L	L	L	
12	12	P	P	P	P	
13	13	V	V	V	V	
14	14	S	T	T	T	
15	15	L	P	P	P	
16	16	G	G	G	G	
17	17	D	E	E	E	
18	18	Q	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	R	R	R	R
25	25	S	S	S	S
26	26	S	S	S	S
27	27	Q	Q	Q	Q
27A	28	N	N	S	S
27B	29	I	I	L	L
27C	30	V	V	L	L
27D	31	H	H	H	H
27E	32	S	S	R	S
28	33	N	N	Y	N
29	34	G	G	G	G
30	35	N	N	Y	Y
31	36	T	T	N	N
32	37	Y	Y	Y	Y
33	38	L	L	L	L
34	39	E	E	D	D
35	40 FR2	W	W	W	W
36	41	Y	Y	Y	Y
37	42	L	L	L	L
38	43	Q	Q	Q	Q
39	44	K	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	L	L	L	L
47	52	L	L	L	L
48	53	I	I	I	I
49	54	Y	Y	Y	Y
50	55 CDR2	K	K	L	L
51	56	V	V	G	G
52	57	S	S	S	S
53	58	N	N	N	N
54	59	R	R	R	R
55	60	F	F	A	A
56	61	S	S	S	S
57	62 FR3	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		S	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		V	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		V	V	V	V
86	91		Y	Y	Y	Y
87	92		Y	Y	Y	Y
88	93		C	C	C	C
89	94	CDR3	F	F	M	M
90	95		Q	Q	Q	Q
91	96		G	G	A	A
92	97		S	S	L	L
93	98		H	H	Q	Q
94	99		V	V	T	T
95	100		P	P	P	P
96	101		L	L	Y	
97	102		T	T	T	
98	103	FR4	F	F	F	
99	104		G	G	G	
100	105		A	Q	Q	
101	106		G	G	G	
102	107		T	T	T	
103	108		K	K	K	
104	109		L	L	L	
105	ПО		E	E	E	
106	111		L	I	I	
106A	112		K	K	K	

Таблиця 10

Ключ до Kabat-нумерації важкого ланцюга

КАВ ТИП		Миш Гум		KABID	VH4-39	VH4-61	Примітки
#	#	12B4	12B4	00033	Гаметн	Гаметна	
		VH	VHvi		лінія	лінія	
1	1FR1	Q	Q	Q	Q	Q	
2	2	v•	V	L	L	V	Верньс - зворотна мутація лише в в 1
3	3	T	Q	Q	Q	Q	
4	4	L	L	L	L	L	
5	5	K	Q	Q	Q	Q	
6	6	E	E	E	E	E	
7	7	S	S	S	S	S	
8	8	G	G	G	G	G	
9	9	P	P	P	P	P	
10	10	G	G	G	G	G	
11	11	I	L	L	L	L	
12	12	L	V	V	V	V	
13	13	Q	K	K	K	K	
14	14	P	P	P	P	P	
15	15	S	S	S	S	S	
16	16	Q	E	E	E	E	
17	17	T	T	T	T	T	
18	18	L	L	L	L	L	
19	19	S	S	S	S	S	
20	20	L	L	L	L	L	
21	21	T	T	T	T	T	
22	22	C	C	C	C	C	
23	23	S	T	T	T	T	
24	24	F	F	V	V	V	V канонічний – зворотна мутація в в1, в2 і в3
25	25	S	S	S	S	S	
26	26	G	G	G	G	G	
27	27	F	F	G	G	G	G канонічний – зворотна мутація в в1, в2 і в3
28	28	S	S	S	S	S	
29	29	L	L	I	I	V	V канонічний – зворотна мутація в в1, в2 і в3
30	30	S	S	S	S	S	

31	31 CDR1	T	T	R	S	S	
32	32	N	N	G	S	G	
33	33	G	G	S	S	G	
34	34	M	M	H	y	Y	
35	35	G	G	Y	Y	Y	
35A	36	V	V	W	w	W	
35B	37	S	S	G	G	S	
36	38 FR2	w	W	W	W	W	
37	39	I	I	I	I	I	
38	40	R	R	R	R	R	
39	41	Q	Q	Q	Q	Q	
40	42	P	P	p	P	P	
41	43	S	P	P	p	P	
42	44	G	G	G	G	G	
43	45	K	K	K	K	K	
44	46	G	G	G	G	G	
45	47	L	L	L	L	L	
46	48	E	E	E	E	E	
47	49	W	W	W	W	W	
48	50	L	L	I	I	I	Верньє - зворотна мутація в в1 і в3 лише
49	51	A	A	G	G	G	Верньє - зворотна мутація в в1лише
50	52 CDR2	H	H	S	S	Y	
51	53	I	I	I	I	f	
52	54	Y	Y	Y	Y	Y	
53	55	W	W	Y	Y	Y	
54	56	D	D	S	S	S	
55	57	E	E	G	G	G	
56	58	D	D	N	S	S	
57	59	K	K	T	T	T	
58	60	R	R	Y	Y	N	
59	61	Y	Y	F	Y	Y	
60	62	N	N	N	N	N	
61	63	P	P	P	P	P	
62	64	S	S	S	S	S	
63	65	L	L	L	L	L	
64	66	K	K	K	K	K	
65	67	S	S	S	S	S	

66	68 FR3	R	R	R	R	R	
67	69	L	L	V	V	V	Верные - зворотна мутація в а1лише
68	70	T	T	T	T	T	
69	71	I	I	I	I	I	
70	72	S	S	S	S	S	
71	73	K	K	V	V	V	канонічний-зворотна мутація в а1, а2 і а3
72	74	D	D	D	D	D	
73	75	T	T	T	T	T	
74	76	S	S	S	S	S	
75	77	N	K	K	K	K	
76	78	N	N	N	N	N	
77	79	Q	Q	Q	Q	Q	
78	80	V	V	F	F	F	Верные - зворотна мутація в а1 і а3
79	81	F	S	S	S	S	
80	82	L	L	L	L	L	
81	83	K	K	K	K	K	
82	84	I	L	L	L'	L	
82A	85	T	S	S	S	S	
82B	86	N	S	S	S	S	
82C	87	V	V	V	V	V	
83	88	D	T	T	T	T	
84	89	T	A	A	A	A	
85	90	A	A	A	A	A	
86	91	D	D	D	D	D	
87	92	T	T	T	T	T	
88	93	A	A	A	A	A	
89	94	T	V	V	V	V	
90	95	Y	Y	Y	Y	Y	
91	96	Y	Y	Y	Y	Y	
92	97	C	C	C	C	C	
93	98	A	A	A	A	A	
94	99	R	R	R	R	R	

95	100	CDR3	R	R	L
95A	-		-	-	G
96	101		R	R	P
97	102		I	I	D
98	103		I	I	D
99	104		Y	Y	Y
100	105		D	D	T
100A	106		V	V	L
100B	107		E	E	D
100C	108		D	D	G
100D	109		Y	Y	-
100E	110		F	F	M
101	111		D	D	D
102	112		Y	Y	V
103	113	FR4	W	W	W
104	114		G	G	G
105	115		Q	Q	Q
106	116		G	G	G
107	117		T	T	T
108	118		T	T	T
109	119		L	V	V
110	120		T	T	T
111	121		V	V	V
112	122		S	S	S
113	123		s	s	S

Гуманізовані антитіла переважно виявляють специфічну афінність до Аβ, принаймні, 10^7 , 10^8 , 10^9 або 10^{10}M^{-1} . Як правило, верхня межа афінності гуманізованих антитіл до Аβ в три, чотири або п'ять разів вища, ніж 12B4 (тобто, $\sim 10^9 \text{M}^{-1}$). Часто нижня межа афінності також в три, чотири або п'ять разів вища, ніж 12B4.

Збирання і експресія VH і VL гуманізованого 12B4, Версія 1.

Фіг.9a є схематичним зображенням стратегії PCR-опосередкованого збирання гуманізованого VL.v1. Фіг.9b є схематичним зображенням стратегії PCR-опосередкованого збирання гуманізованого VH.v1. В Таблиця 11 наведені праймери, які використовуються при PCR-опосередкованому збиранні 12B4v1.

Таблиця 11

Синтетичні олігонуклеотиди, які використовуються при збиранні
V областей гуманізованого 12B4, v1 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR)

ДНК #	Розмір	Кодуючий ланцюг	Послідовність	Примітки
4881	135	Так	gagattaagcctgcccgcaccATGAGGCT CCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGC TCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATGTT GTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTACCCCTGGAGAGCCG	гум12B4 VLbIA праймер, синтезований Oligos etc. нт 1>115 12B4VLII. конс. в розумінні ланцюг. Додають HindIII сайт + консенсуна послідовність Kozak.
			SEQ ID NO: 13	
4882	131	Hi	AGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCTG CAGGTACCATTCCAAATAGGTGTTTCCAT TACTATGAACAATGTTCTGACTAGACCTG CAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGT GACGGGCAGGGAGAG	гум12B4 VLbIB праймер, синтезований Oligos etc. Зворотна послідовність ДНК комплементу 12B4VLbI. конс. (85, 215)
			SEQ ID NO: 14	
4883	132	Так	TGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTC CTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTC TGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTG GATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTG	гум12B4 VLbIC праймер, синтезований Oligos etc. нт 185>316 12B4VLb1. конс., в розумін. ланцюг.
			SEQ ID NO: 15	
4884	130	Hi	tgatatggatccactcacGTTTGATCTCC AGCTTGGTCCCCTGACCGAACGTGAGCGG AACATGTGAACCTTGAAAGCAGTAATAAA CCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTG ATTTTCAGTGTAAT	гум12B4 VLbID праймер, синтезований Oligos etc. Зворотна послідовність ДНК комплементу 12B4VLb1. конс. (286,397) додають сплайсуючий донор+ BamHI сайт
			SEQ ID NO: 16	
4885	143	Так	gagataaagctgcccgcaccATGAAGCA CCTGTGGTCTCTCCTCCTGCTGGTGGCAG CTCCCAGATGGGTCTCTCCAGGTGCAG CTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGAGACCCCTGTCCCTCACCTG	гум12B4 VHaIA праймер, синтезований Oligos etc, 12B4VHaI. конс., нт. 1-122, додають Kozak консенсус і Hind III сайт
			SEQ ID NO: 17	
4886	137	Hi	TCCTCATCCCAATAGATGTGTGCCAGCCA CTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTGCCGGA TCCAGCTCACACCCATACCATTAGTGCTC AGGGAAAAACCAGAGAAAGTGCAGGTGAG GGACAGGGTCTCCGAAGGCTT	гум12B4 VHaIB праймер, синтезований Oligos etc. Зворотна послідовність ДНК комплементу 12B4VHaI. конс. (94, 230)
			SEQ ID NO: 18	
4887	138	Так	GTGGCTGGCACACATCTATTGGGATGAGG ACAAGCGCTATAACCCATCCCTCAAGAGT CGACTCACCATATCAAAGGACACGTCCAA GAACCAGGTATCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCTGCAGACACGGCCGT	гум12B4 VHaIC праймер, синтезований Oligos etc. 12B4VHaI. конс. нт. 201-338
			SEQ ID NO: 19	
4888	139	Hi	tcatatggatccactcacCTGAGGAGACG GTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTC AAAGTAGTCTCAACATCATAGATGATCC TCCTTCTGCACAGTAATACACGGCCGTG TCTGCAGCGGTACAGAGCTCAG	гум12B4 VHaID праймер, синтезований Oligos etc. Зворотна послідовність ДНК комплементу 12B4VHaI. конс. (307,427) додають сплайсуючий донор + BamHI сайт до 3' кінця.
			SEQ ID NO: 20	
4889	22	Так	gag att aag ctt gcc gcc ace A	гум 12B4 VLbI, A+B вперед праймер % A+T = 45.45 [10]; % C+G = 54.55 [12] Davis, Botstein, Roth температура відпакування C. 64.54
			SEQ ID NO: 21	
4890	21	Hi	AGG AGC TGT GGA GAC TGC CCT	гум 12B4 VLbI, A+B назад праймер % A+T = 38.10 [8]; % C+G = 61.90 [13] Davis, Botstein, Roth температура відпакування C° 66.47
			SEQ ID NO: 22	

4891	20	Tak	TGC AGA AGC CAG GGC AGT CT	гум 12B4 VLel, C+D вперед праймер % A+T = 40.00 [8]; % C+G = 60.00 [12] Davis, Botstein, Roth температура відпалювання C. 64.50
			SEQ ID NO: 23	
4892	28	Hi	tga tat gga tcc act cac GTT TGA TCT C	гум 12B4 VLel, C+D назад праймер % A+T = 57.14 [16]; % C+G = 42.86 [12] Davis, Botstein, Roth, температура відпалювання C. 64.61
			SEQ ID NO: 24	
4893	23	Tak	gag ata aag cti gcc gcc ace AT	гум 12B4 VHbl, A+B вперед праймер % A+T = 47.83 [11]; % C+G = 52.17 [12] Davis, Botstein, Roth, температура відпалювання C. 64.55
			SEQ ID NO: 25	
4894	24	Hi	TCC TCA TCC CAA TAG ATG TOT GCC	гум 12B4 VHvl, A+B назад праймер % A+T = 50.00 [12]; % C+G = 50.00 [12] Davis, Botstein, Roth, температура відпалювання C. 64.57
			SEQ ID NO: 26	
4895	22	Tak	GTG GCT GGC ACA CAT CTA TTG G	гум 12B4 VHvl/ C+D вперед праймер % A+T = 45.45 [10]; % C+G = 54.55 [12] Davis, Botstein, Roth, температура відпалювання C. 64.54
			SEQ ID NO: 27	
4896	24	Hi	tea tat gga tcc act cac CTG AGG	гум 12B4 VHvl, C+D вперед праймер % A+T = 50.00 [12]; % C+G = 50.00 [12] Davis, Botstein, Roth температура відпалювання C. 64.57
			SEQ ID NO: 28	

Еквімолярні співвідношення VHb1A+VHb1B та VHb1C+VHb1D синтетичних фрагментів були гібридизовані як пари, в окремих реакційних пробірках з використанням стандартних Процесик. Реакція A+B гібридизації виконувалась шляхом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) за допомогою праймерів A+B вперед і A+B назад, температура відпалювання 60°C, 25 циклів (вперед і назад, альтернативно, звор або зворотньо). Аналогічно, реакція гібридизації C+D виконувалась шляхом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) за допомогою праймерів C+D вперед і C+D назад в однакових умовах. Зібрані за допомогою PCR 5' A+B половина, і 3' C+D половина, були очищені в гелі для остаточного збирання за допомогою PCR. На збирання всієї V-області впливали, перемішуючи A+B зібрану 5' половину з C+D 3' половиною V-області, гібридизуючи, і застосовуючи PCR за допомогою праймера VHb1 A+B вперед, праймера і VHb1C+D назад. Повні VH і VL області, зібрані таким чином, очищували в гелі і клонували в pCRScript для верифікації ДНК послідовності.

Нуклеотидні послідовності гуманізованого 12B4VL (версія 1) (SEQ ID NO:5) і 12B4VH (версія 1) (SEQ ID NO: 7) наведені нижче в Таблицях 12 і 13, відповідно.

Таблиця 12. Нуклеотидна послідовність гуманізованого 12B4VLb1.

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGG
GGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCT
20 CCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAACATTGTTTCATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAA
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCG
ATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGA
AAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACAT
GTTCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

Таблиця 13. Нуклеотидна послідовність гуманізованого 12B4VHb1.

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCA
GGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCA
CCTGCACTTTCTCTGGTTTTTCCCTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATCCGG
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACACATCTATTGGGATGAGGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCAAAGGACACGTCCTCAAGAACCAGG
TATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCAG

В. Версія 2 гуманізованого антитіла 12B4.

Друга версія гуманізованого 12B4 була створена при наявності кожної заміни, показаної для версії 1, виключаючи L→V заміну залишку 2, I→L заміну на місці, залишку 48, G→A заміну в залишку 49, V→L заміну на місці залишку 67 і F→V заміну залишку 78. Нуклеотидні послідовності версії 2 легкого і важкого ланцюгів гуманізованого 12B4 позначаються далі як SEQ ID NOs:5 і 9, відповідно. Амінокислотні послідовності версії 2 легкого і важкого ланцюгів гуманізованого 12B4 позначаються далі як SEQ ID NOs:6 і 10, відповідно.

С. Версія 3 гуманізованого антитіла 12B4

Третя версія гуманізованого 12B4 була створена при наявності кожної заміни, показаної для версії 1, за винятком L→V заміни залишку 2, G→A заміни залишку 49 і V→L заміни залишку 67. Нуклеотидна послідовність версії 3 легкого і важкого ланцюгів гуманізованого 12B4 позначаються далі як SEQ ID NOs:5 і 11, відповідно. Амінокислотна послідовність версії 3 легкого і важкого ланцюгів гуманізованого 12B4 позначається далі як SEQ ID NOs:6 і 12, відповідно.

Приклад VI. Профілактика і лікування людей.

На першій фазі випробувань одноразова доза була введена, для того щоб визначити безпечність цього лікування для людини. Терапевтичний засіб вводиться різним пацієнтам у дозах, що зростають, починаючи, приблизно, від 0.01 тієї очікуваної дози, яка має виявляти ефективність, і збільшуючи її втричі до того часу, поки не буде досягнуто рівня, що перевищує в 10 разів дозу, ефективну для мишей.

На другій фазі було виконано випробування, для того щоб визначити терапевтичну ефективність засобу. Пацієнтів з ранніми або середніми проявами хвороби Альцгеймера визначали за допомогою критеріїв Асоціації хвороби Альцгеймера і пов'язаних з нею розладів (ADRD) для визначення потенційних хворих на АХ. Відповідних пацієнтів оцінювали по 12-26-бальній шкалі експрес Процесу оцінки психічного стану (Mini-Mental State Exam, MMSE). Іншими критеріями відбору пацієнтів було те, що пацієнти повинні були залишитися живими протягом дослідження, і відсутність одночасного застосування інших ліків, що могло б зумовити певні ускладнення. Початкова оцінка функцій пацієнта виконували з використанням класичних психометричних Процесів, таких як MMSE, і ADAS, які включають наявність вичерпної шкали для оцінювання статусу і функцій пацієнтів з хворобою Альцгеймера. Ці психометричні шкали забезпечують критерії оцінки прогресування стану хворих на хворобу Альцгеймера.

Прийнятні шкали для оцінки якості життя теж були використані для здійснення моніторингу лікування. За прогресуванням хвороби можна також стежити за допомогою магнітно-резонансної томографії (MRI). Потрібно також стежити за профілем антитіл в крові пацієнта, що передбачає застосування аналізів на імуногенну специфічність антитіла і реакцію Т-лімфоцитів.

Після визначення початкових значень, пацієнти починають отримувати лікування. Вони рандомізуються і отримують лікування або з використанням терапевтичного засобу, або плацебо, всліпу. За пацієнтами здійснюють моніторинг, щонайменше, кожних шість місяців. Ефективність визначається за наявністю істотного зменшення прогресування хвороби у групи, що отримувала лікування, порівняно з групою, яку лікували плацебо.

На другій фазі II випробування проводили, для того щоб оцінити перехід пацієнтів від ранньої втрати пам'яті, не пов'язаної з деменцією альцгеймерівського типу, інколи її ще називають зумовленими віком порушеннями пам'яті (AAMI), або легких когнітивних порушень, до потенційної хвороби Альцгеймера, як визначено за критеріями ADRD. Пацієнти з високим ризиком конверсії до хвороби Альцгеймера відбираються з неклінічної групи шляхом скринінгу еталонних популяцій щодо ранніх проявів втрати пам'яті або інших проблем, пов'язаних з передальцгеймерівською симптоматологією, наявністю хвороби Альцгеймера в сімейному анамнезі, факторами генетичного ризику, віком, статтю, та іншими особливостями, виявленими для того щоб передбачити високий ризик виникнення хвороби Альцгеймера. Збираються початкові підрахунки на основі прийнятних шкал, включаючи MMSE і ADAS, разом з іншими психометричними параметрами, опрацьованими для того, щоб повніше оцінити нормальну популяцію. Ці популяції пацієнтів поділяються на прийнятні групи для порівняння ефекту від застосування препарату і від плацебо. За цими популяціями пацієнтів спостерігали через проміжки часу біля 6 місяців, кінцевою точкою для кожного пацієнта було, чи повертає він або вона до можливої хвороби Альцгеймера, як це визначають критерії ADRD, наприкінці спостереження.

Хоча вищезгаданий винахід був описаний детально з метою чіткості і зрозумілості, було б очевидним, якщо певні модифікації могли бути застосовані в рамках стверджень, які додаються. Всі публікації і патентні документи, процитовані тут, а також текст, який присутній в фігурах і перелік послідовностей, включені, таким чином, як довідкова інформація у повному обсязі для будь-яких цілей, тією мірою, як це може бути визначено у кожному окремому випадку.

Із вищезгаданого, буде очевидним, що винахід передбачає цілу низку застосувань. Наприклад, винахід передбачає використання будь-яких антитіл до Аβ, описаних вище, для лікування, профілактики або

діагностики амілоїдогенної хвороби або у виробництві медикаментів або діагностичних композицій для використання з тією ж метою.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ЕЛАН ФАРМА ІНТЕРНЕШЕНЛ ЛІМІТЕД
БАЙЕТ

<120> ГУМАНІЗОВАНІ АНТИТІЛА, ЯКІ РОЗПІЗНАЮТЬ БЕТА АМІЛОЇДНИЙ ПЕПТИД

<130> 15270С-015710UA

<140> UA 20041008271

<141> 2003-03-12

<150> PCT/US2003/007715

<151> 2003-03-12

<150> 60/363,751

<151> 2002-03-12

<160> 41

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 393

<212> ДНК

<213> Mus m`яз

<220>

<221> сигн.-пептид

<222> (1)..(57)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(393)

<400> 1

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
1 5 10 15	
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	
20 25 30	
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	
35 40 45	
gtt cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca	192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
50 55 60	
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	
65 70 75 80	
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	
85 90 95	
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc	336

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

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
 115 120 125

gag ctg aaa 393
 Glu Leu Lys
 130

<210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus M'83

<220>
 <221> CИГНАЛ
 <222> (1)..(19)

<400> 2
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

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

Glu Leu Lys
 130

<210> 3
 <211> 426
 <212> ДНК
 <213> Mus M'83

<220>
 <221> сигн.-пептид
 <222> (1)..(57)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(426)

<400> 3
 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
 1 5 10 15
 gtc ctg tcc cag gtt act ctg aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg cag 96
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30
 ccc tcc cag acc ctg agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag 192
 Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60
 ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gag gac aag cgc tat 240
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80
 aac cca tcc ctg aag agc cgg ctg aca atc tcc aag gat acc tct aac 288
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn
 85 90 95
 aat cag gta ttc ctg aag atc acc aat gtg gac act gct gat act gcc 336
 Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 aca tac tac tgt gct cga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac 384
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 115 120 125
 ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctg aca gtc tcc tca 426
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 4
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Mus M'я3

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1)..(19)

<400> 4
 Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn
 85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 5

<211> 396

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
 12B4VLv1 полінуклеотид

<220>

<221> сигн.-пептид

<222> (1)..(60)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(396)

<400> 5

atg agg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct 48
 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

gga tcc agt ggg gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc 96
 Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag aac 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn
 35 40 45

att gtt cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag 192
 Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt 240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

tct ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac 336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt cag ggg acc aag 384
Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

ctg gag atc aaa 396
Leu Glu Ile Lys
130

<210> 6

<211> 132

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VLvl поліпептид

<220>

<221> СИГНАЛ

<222> (1)..(20)

<400> 6

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 7
 <211> 426
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
 12B4VHv1 полінуклеотид

<220>
 <221> сигн.-пептид
 <222> (1)..(57)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(426)

<400> 7
 atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 oct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg 144
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag 192
 Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 gga ctg gag tgg ctg gca cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat 240
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80
 aac cca tcc ctc aag agt cga ctc acc ata tca aag gac acg tcc aag 288
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 aac cag gta tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc 336
 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac 384
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 115 120 125
 ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 426
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 8
<211> 142
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VHv1 поліпептид

<220>
<221> СИГНАЛ
<222> (1)..(19)

<400> 8
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 9
<211> 426
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VLv2 полінуклеотид

<220>

<221> СИГН.-пептид

<222> (1)..(57)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(426)

<400> 9

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

cct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg 144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag 192
Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

gga ctg gag tgg att ggg cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat 240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
65 70 75 80

aac cca tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca aag gac acg tcc aag 288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc 336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac 384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
115 120 125

ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 426
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 10

<211> 142

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VLv2 поліпептид

<220>

<221> СИГНАЛ

<222> (1)..(19)

<400> 10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 11

<211> 426

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VHv2 полінуклеотид

<220>

<221> сигн.-пептид

<222> (1)..(57)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(426)

<400> 11

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tgg ggc cca gga ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg 144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag 192

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	
gga ctg gag tgg ctg ggg cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat	240
Gly Leu Glu Trp Leu Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr	
65 70 75 80	
aac cca tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca aag gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag gta tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc	336
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac	384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr	
115 120 125	
ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca	426
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210> 12

<211> 142

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний гуманізований
12B4VHV2 поліпептид

<220>

<221> СИГНАЛ

<222> (1)..(19)

<400> 12

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100

105

110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 13

<211> 135

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 13

gagattaagc ttgccgccac catgaggctc cctgctcagc tectggggct gctaagtctc 60

tgggtctctg gatccagtgg ggatgttctg atgactcagt ctccactctc cctgcccgctc 120

acccttgag agccg 135

<210> 14

<211> 131

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 14

aggagctgtg gagactgcc ttgcttctgc aggtaccatt ccaaataagg gtttccatta 60

ctatgaacaa tgttctgact agacctgcag gagatggagg ccggctctcc aggggtgacg 120

ggcagggaga g 131

<210> 15

<211> 132

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 15

tgcagaagcc agggcagctt ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg 60

gggtccctga caggttcagt ggcagtggat caggcacaga ttttacctg aaaatcagca 120

gagtggaggc tg 132

<210> 16

<211> 130

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 16

tgatatggat ccactcacgt ttgatctoca gcttggtccc ctgaccgaac gtgagcggaa 60

catgtgaacc ttgaaagcag taataaaccc caacatcttc agcctccact ctgctgattt 120

tcagtgtaaa 130

<210> 17

<211> 143

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 17

gagataaagc ttgcggccac catgaagcac ctgtggttct tctctctgct ggtggcagct 60

cccagatggg tctgtccca ggtgcagctg caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct 120

toggagaccc tgtccctcac ctg 143

<210> 18

<211> 137

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 18

tctcatccc aatagatgtg tgccagccac tccagtcctt tccctggggg ctgccggatc 60

cagctcacac ccataccatt agtgctcagg gaaaaaccag agaaagtga ggtgagggac 120

aggggtctccg aaggctt 137

<210> 19

<211> 138

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 19

gtggctggca cacatctatt gggatgagga caagcgctat aaccatccc tcaagagtcg 60

actcaccata tcaaaggaca cgtccaagaa ccaggatatcc ctgaagctga gctctgtgac 120

cgtgcagac acggccgt 138

<210> 20

<211> 139

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 20

tcatatggat ccactcacct gaggagacgg tgaccgtggt cccttgccc cagtagtcaa 60

agtagtcctc aacatcatag atgacacctc ttctcgaca gtaatacacg gccgtgtctg 120

cagcggtcac agagctcag 139

<210> 21

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 21

gagattaagc ttgccgccac ca 22

<210> 22

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 22

aggagctgtg gagactgccc t. 21

<210> 23

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 23

tgcagaagcc agggcagtct 20

<210> 24

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

<400> 24

tgatatggat ccactcacgt ttgatctc 28

<210> 25

<211> 23

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

 <400> 25
 gagataaagc ttgcccgcac cat 23

 <210> 26
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

 <400> 26
 tctctatccc aatagatgtg tgcc 24

 <210> 27
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

 <400> 27
 gtggctggca cacatctatt gg 22

 <210> 28
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер

 <400> 28
 tcatatggat ccactcacct gaag 24

 <210> 29
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Людина

 <220>
 <221> сигн.-пептид
 <222> (1) .. (60)

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (360)

 <400> 29
 atg agg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct 48
 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser

1	5	10	15	
gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc				96
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro				
	20	25	30	
gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc				144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser				
	35	40	45	
ctc ctg cat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag				192
Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys				
	50	55	60	
cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc				240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala				
	65	70	75	80
tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt				288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe				
	85	90	95	
aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac				336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr				
	100	105	110	
tgc atg caa gct cta caa act cct				360
Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro				
	115	120		

<210> 30
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Людина

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1)..(20)

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro
 115 120

<210> 31
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Людина

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(300)

<400> 31
 gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat cgt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 tat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Tyr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 cta caa act ccg 300
 Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 32
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Людина

<400> 32
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30

Tyr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 33
 <211> 407
 <212> ДНК
 <213> Людина

<220>
 <221> сигн.-пептид
 <222> (3)..(38)

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(407)

<400> 33
 tc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg gtc ctg tcc cag ctg cag 47
 Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln
 1 5 10 15
 ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc 95
 Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
 20 25 30
 ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga ggt agt cac tac 143
 Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Gly Ser His Tyr
 35 40 45
 tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att ggg 191
 Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 50 55 60
 agt atc tat tat agt ggg aac acc tac ttt aac ccg tcc ctc aag agt 239
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 65 70 75
 cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag 287
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 80 85 90 95
 ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga 335
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 ctc ggc cct gat gac tat acc ctt gac ggt atg gac gtc tgg ggc caa 383

Leu Gly Pro Asp Asp Tyr Thr Leu Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 115 120 125

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

407

<210> 34
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Людина

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1)..(12)

<400> 34
 Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu
 20 25 30

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Gly Ser His Tyr Trp
 35 40 45

Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser
 50 55 60

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

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu
 85 90 95

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu
 100 105 110

Gly Pro Asp Asp Tyr Thr Leu Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 35
 <211> 356
 <212> ДНК
 <213> Людина

<220>
 <221> сигн.-пептид
 <222> (1)..(57)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 35

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc gtc	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val	
35 40 45	
agc agt ggt ggt tac tac tgg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag	192
Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	
gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac tac	240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr	
65 70 75 80	
aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc	336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
gtg tat tac tgt gcg aga ga	356
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
115	

<210> 36
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Людина

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1)..(19)

<400> 36

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

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
115

<210> 37
<211> 356
<212> ДНК
<213> Людина

<220>
<221> сигн.-пептид
<222> (1)..(57)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 37
atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

agc agt agt agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag 192
Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

ggg ctg gag tgg att ggg agt atc tat tat agt ggg agc acc tac tac 240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag 288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

aac cag ttc tcc ctg aag ctg ago tct gtg acc gcc gca gac acg gct 336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

gtg tat tac tgt gcg aga ca 356
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
115

<210> 38
<211> 118
<212> PRT
<213> Людина

<220>
<221> СИГНАЛ
<222> (1)..(19)

<400> 38
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
115

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Людина

<400> 39
Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus м'яз

<400> 40
Leu Glu Gly Gly Pro
1 5

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> Людина

<400> 41

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
20 25 30

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Фіг. 1В

		70	80
12B4VL			
гум 12B4VL в1	S	G V P D R F S S S G S G T D S T L K I	80
kabid 005036	S	G V P D R F S S S G S G T D S T L K I	80
x63397 VL гаметної лінії	S	G V P D R F S S S G S G T D S T L K I	80
		90	100
12B4VL			
гум 12B4VL в1	S	R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P	100
kabid 005036	S	R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P	100
x63397 VL гаметної лінії	S	R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P	100
		110	
12B4VL			
гум 12B4VL в1	L	T F G A G T K L E L K	112
kabid 005036	L	T F G Q G T K L E I K	112
x63397 VL гаметної лінії	Y	T F G Q G T K L E I K R T	114



Канонічний/CDR



Поверхні розділу/пакувальний

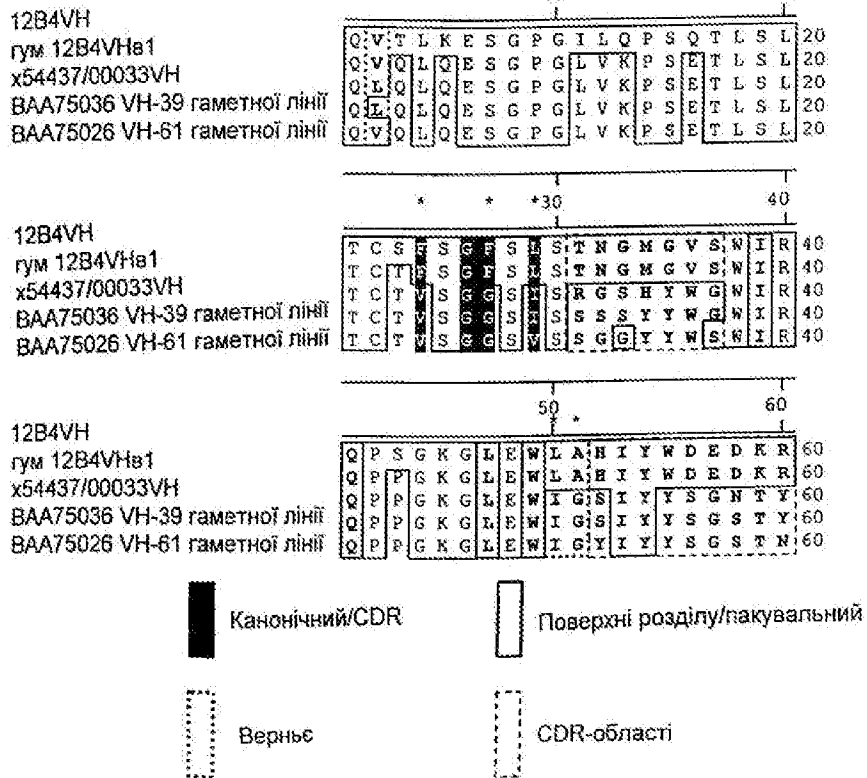


CDR-області

* поодинокі зворотні мутації
залишка людина → миша

Умовні позначення: блоки залишків,
які повністю відповідають 12B4VH

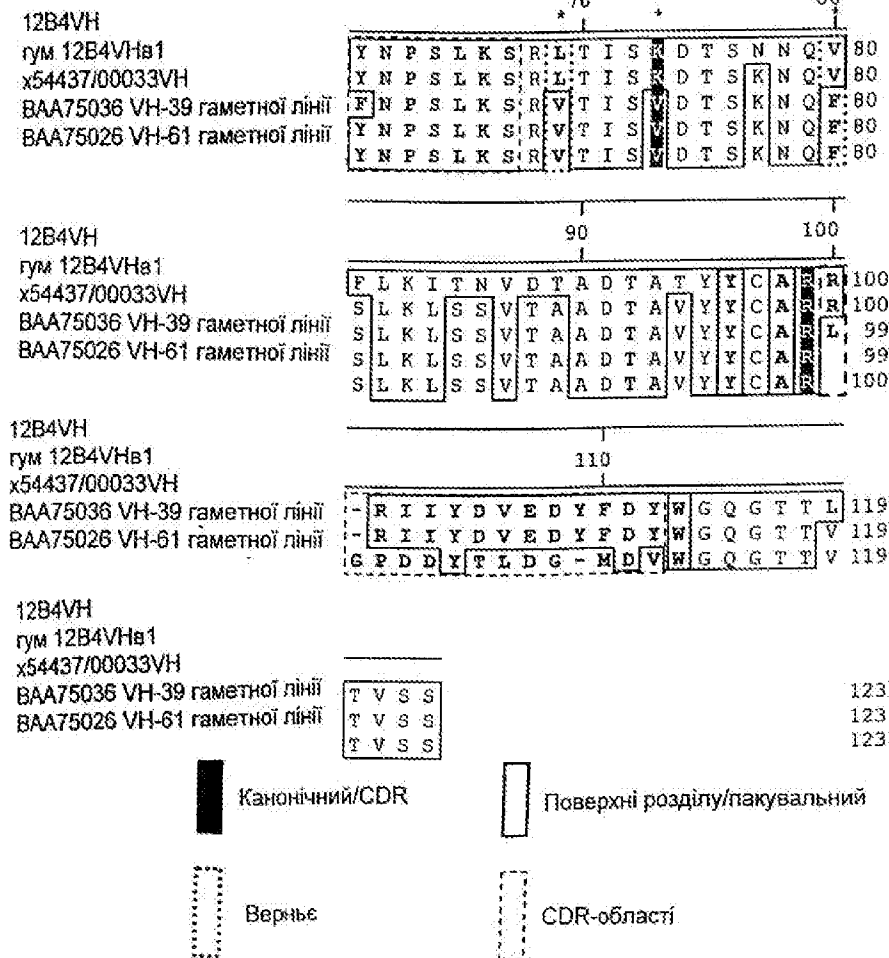
Фіг. 2А



* поодинокі зворотні мутації
залишка людина → миша

Умовні позначення: блоки залишків,
які повністю відповідають 12B4VH

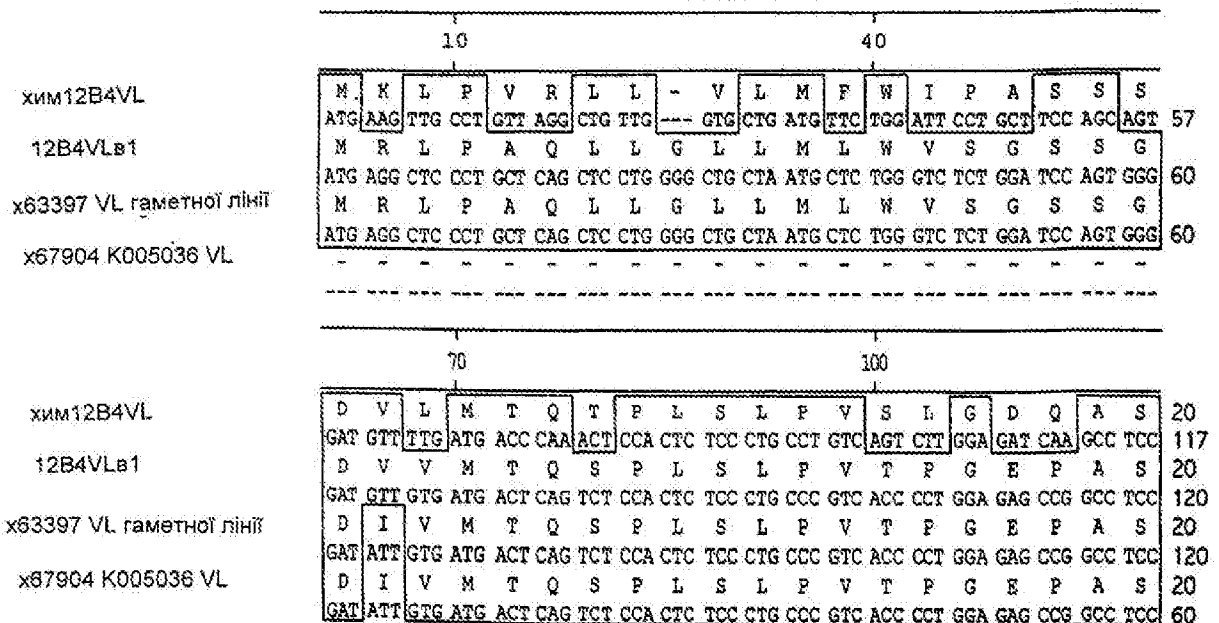
Фіг. 2В



* поодинокі зворотні мутації
залишка людини → миша

Умовні позначення: блоки залишків,
які повністю відповідають 12B4VH

Фіг. 3А



Фіг. 3В

хим12B4VL	I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E W	40
12B4VLb1	ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC ATT GTT CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG	177
х63397 VL гаметної лінії	I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E W	40
х67904 K005036 VL	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AAC ATT GTT CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTG GAA TGG	180
	I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W	40
	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG	180
	I S C R S S Q S L L H R Y G Y N Y L D W	40
	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT CGT TAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG	120

	190	220	
хим12B4VL	Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F	60	
12B4VLb1	TAC CTG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	237	
х63397 VL гаметної лінії	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F	60	
х67904 K005036 VL	TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	240	
	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A	60	
	TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG GCC	240	
	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A	60	
	TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG GCC	180	

Фіг. 3С

хим12B4VL	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I	80
12B4VLb1	TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC	297
х63397 VL гаметної лінії	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I	80
х67904 K005036 VL	TCT GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC	300
	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I	80
	TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC	240

	310	340	
хим12B4VL	S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P	100	
12B4VLb1	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TAC TGC TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCG	357	
х63397 VL гаметної лінії	S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P	100	
х67904 K005036 VL	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCG	360	
	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P	100	
	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCT	360	
	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P	100	
	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCG	300	

Фіг. 3D

	370	
хим12B4VL	L T F G A G T K L E L K	112
12B4VLb1	CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA	393
х63397 VL гаметної лінії	L T F G Q G T K L E I K	112
х67904 K005036 VL	CTC ACG TTC GGT CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA	396

Умовні позначення:
виділені блоки залишків, які точно
відповідають 12B4VLb1 консенсу.

Фиг. 4А

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 КАВ000333 VН
ВАА75026 VН4-61 гаметної лінії

40										70											
M	D	R	L	T	S	S	P	L	L	L	I	V	P	A	Y	V	L	S	Q	1	
ATG	GAC	AGG	CTT	ACT	TCC	TCA	TTC	CTG	CTG	CTG	ATT	GTC	CCT	GCA	TAT	GTC	CTG	TCC	CAG	60	
M	K	H	L	N	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	N	V	L	S	Q	1	
ATG	AAG	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTG	CTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	60		
-	-	-	-	-	-	-	-	L	L	L	V	A	A	P	R	N	V	L	S	Q	1
-	-	-	-	-	-	-	-	CTC	CTG	CTG	GTG	GCG	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	39
M	K	H	L	N	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	N	V	L	S	Q	1	
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	60	

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 КАВ000333 VН
ВАА75026 VН4-61 гаметної лінії

100										130										
V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	T	L	S	L	T	21
GTT	ACT	CTG	AAA	GAG	TCT	GGC	CCT	GGG	ATA	TTC	CAG	CCC	TCC	CAG	ACC	CTC	AGT	CTG	ACT	120
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	120
L	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
CTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	99
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	120

Фиг. 4В

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 КАВ000333 VН
ВАА75026 VН4-61 гаметної лінії

160										190										
C	S	F	S	G	F	S	L	S	T	N	G	M	G	V	S	W	I	R	Q	41
TGT	TCT	TTC	TCT	GGG	TTT	TCA	CTG	AGC	ACT	AAT	GGT	ATG	GGT	GTG	AGC	TGG	ATT	CGT	CAG	180
C	T	F	S	G	F	S	L	S	T	N	G	M	G	V	S	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	TTC	TCT	GGT	TTT	TCC	CTG	AGC	ACT	AAT	GGT	ATG	GGT	GTG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	180
C	T	V	S	G	G	S	I	S	R	G	S	H	Y	W	G	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGA	GGT	AGT	CAC	TAC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGC	CAG	159
C	T	V	S	G	G	S	V	S	S	G	G	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	GTC	AGC	AGT	GGT	GGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	180

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 КАВ000333 VН
ВАА75026 VН4-61 гаметної лінії

220										250										
P	S	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	W	D	E	D	K	R	Y	61
CCT	TCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	GCA	CAC	ATT	TAC	TGG	GAT	GAG	GAC	AAG	CGC	TAT	240
P	P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	W	D	E	D	K	R	Y	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	CTG	GCA	CAC	ATC	TAT	TGG	GAT	GAG	GAC	AAG	CGC	TAT	240
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	S	I	Y	Y	S	G	N	T	Y	F	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT	ATC	TAT	TAT	AGT	GGG	AAC	ACC	TAC	TTT	219
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	N	Y	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	240

Фіг. 4С

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 KAB000333 VН
BAA75026 VН4-61 гаметної лінії

280												310											
N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	N	N	Q	V	F				81
AAC	CCA	TCC	CTG	AAG	AGC	CGG	CTC	ACA	ATC	TCC	AAG	GAT	ACC	TCT	AAC	AAT	CAG	GTA	TTC				300
N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	V	S				81
AAC	CCA	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	CTC	ACC	ATA	TCA	AAG	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	GTA	TCC				300
N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S				81
AAC	CCG	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCT	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC				279
N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S				81
AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC				300

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 KAB000333 VН
BAA75026 VН4-61 гаметної лінії

340												370											
L	K	I	T	N	V	D	T	A	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	R	R				101
CTC	AAG	ATC	ACC	AAT	GTG	GAC	ACT	GCT	GAT	ACT	GCC	ACA	TAC	TAC	TGT	GCT	CGA	AGG	AGG				360
L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	R				101
CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	AGG	AGG				360
L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	G				101
CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	CTC	GCG				339
L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R						99
CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA						354

Фіг. 4D

хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 KAB000333 VН
BAA75026 VН4-61 гаметної лінії

400												430											
I	I	Y	D	V	E	D	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V				121
ATC	ATC	TAT	GAT	GTT	GAG	GAC	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GCC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC				420
I	I	Y	D	V	E	D	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V				121
ATC	ATC	TAT	GAT	GTT	GAG	GAC	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC				420
P	D	D	Y	T	L	D	G	H	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V				121
CCT	GAT	GAC	TAT	ACC	CTT	GAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC				399

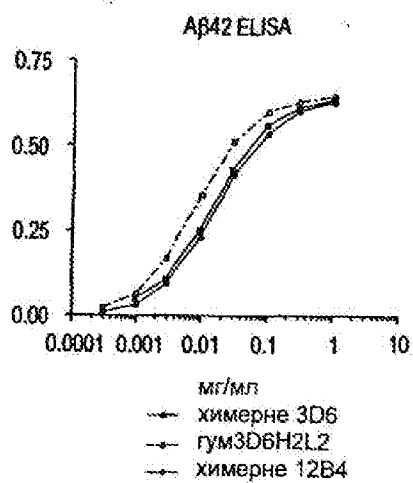
2. хим12В4VН
12В4VНв1
х54437 KAB000333 VН
BAA75026 VН4-61 гаметної лінії

S	S
TCC	TCA
S	S
TCC	TCA
S	S
TCC	TCA

123
426
123
426
123
405

Умовні позначення:
виділені блоки залишків, які точно
відповідають 12В4VНв1 консенс.

Фіг. 5А



Фіг. 5В

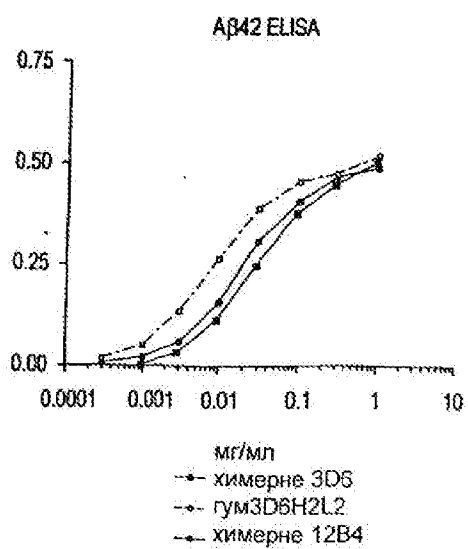


Fig. 6

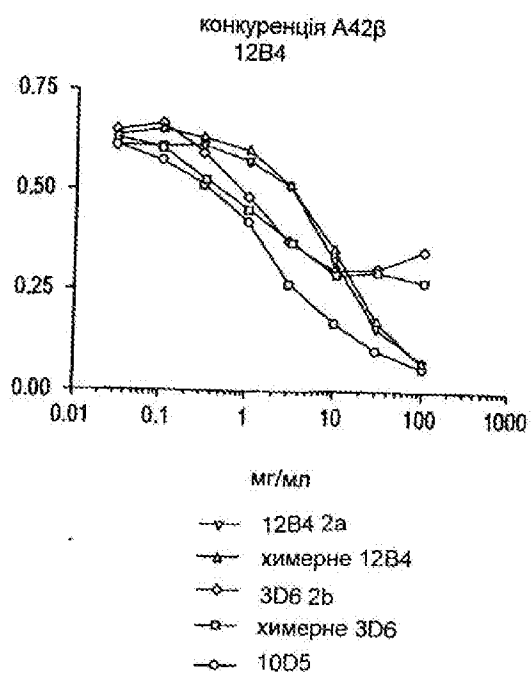
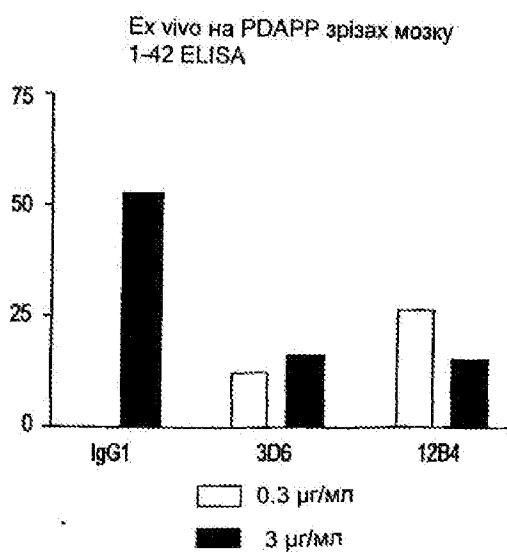


Fig. 7



Фіг. 8А

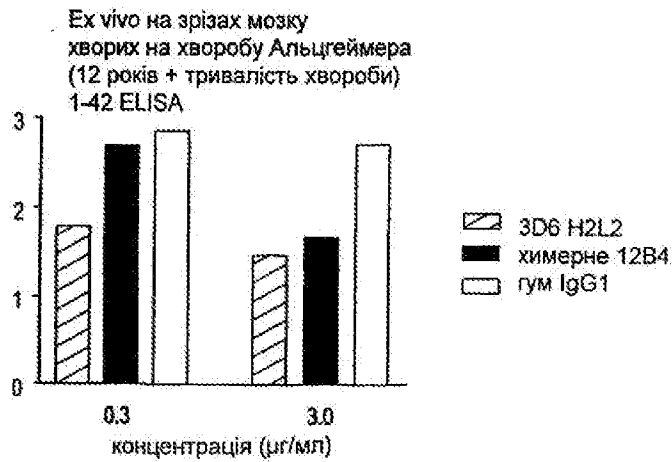
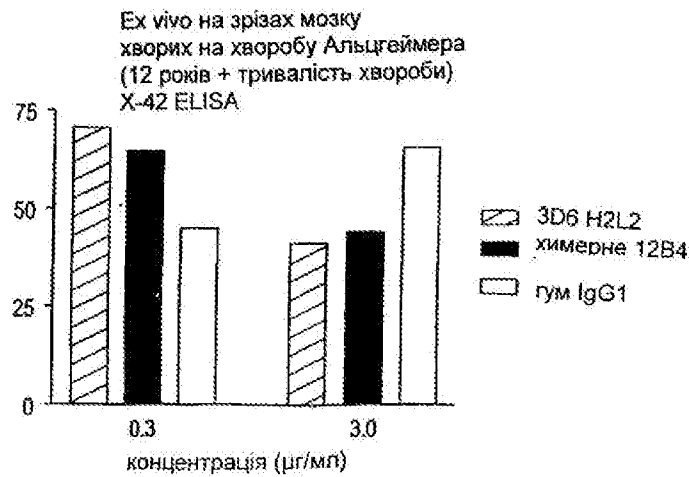
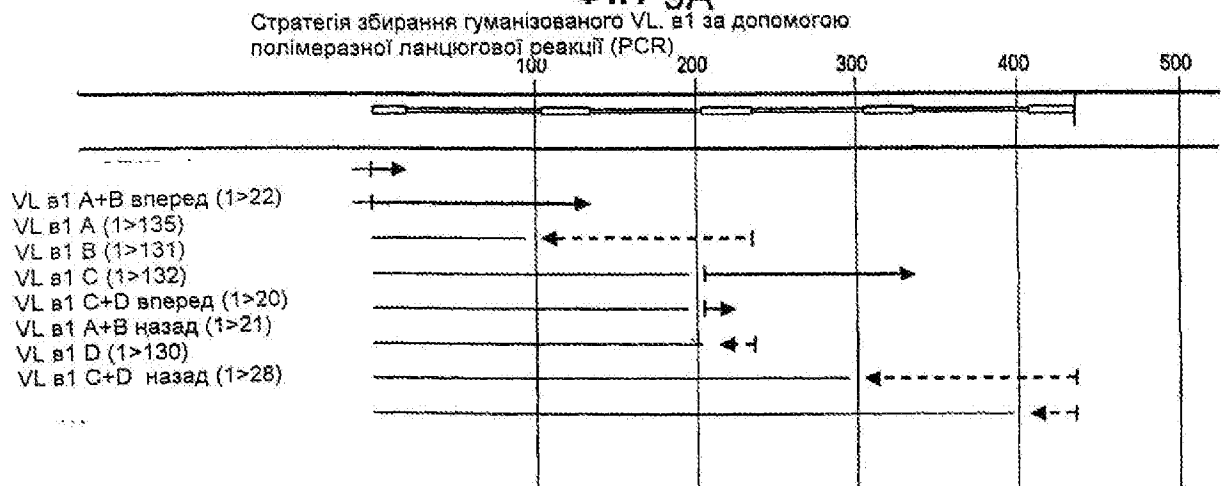


FIG. 8B



Фіг. 9А



Фіг. 9В

Стратегія збирання гуманізованого V_H. в1 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR)

