

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201791711 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.11.30

(22) Дата подачи заявки
2016.01.28

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ТРАНСТИРЕТИНУ

(31) 62/109,001; 62/266,557

(32) 2015.01.28; 2015.12.11

(33) US

(86) PCT/IB2016/050414

(87) WO 2016/120809 2016.08.04

(71) Заявитель:
ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС
ЛИМИТЕД (IE); ЮНИВЕРСИТИ
ХЭЛС НЕТУОРК (CA)

(72) Изобретатель:
Ниджджар Тарлохан С. (US),
Чакрабартти Авиджит (CA), Хигаки
Джефффри Н. (US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Котов И.О., Буре Н.Н.,
Стойко Г.В. (RU)

(57) В изобретении предложены антитела, которые специфически связывают транстиретин (TTR). Антитела могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболеваний или нарушений, связанных с накоплением TTR или накоплением отложений TTR (например, TTR-амилоидоза). Антитела также могут быть использованы для диагностики TTR-амилоидоза и ингибирования, или уменьшения агрегации TTR, помимо других применений

	10	20	30	40	
m5A1VH	EVKLIVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS				42
3LS4 H St. pro	EVKLIVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS				42
AGP01680	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS				42
Hu5A1VHv1	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS				42
Hu5A1VHv2	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS				42
	50	60	70	80	
m5A1VH	RRLEWVAISISGGSTYYPDVSKGRFTISRDNARNILYLQMS				84
3LS4 H St. pro	RRLEWVAISISGGSTYYPDVSKGRFTISRDNARNILYLQMS				84
AGP01680	KGLNWVSIISSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Hu5A1VHv1	KGLNWVSIISSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Hu5A1VHv2	KGLNWVSIISSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
	90	100	110		
m5A1VH	LRSEDTAMYYCVRYYYGQYFDYWGQGTLLTVSS			117 (SEQ ID NO:1)	
3LS4 H St. pro	LRSEDTAMYYCVRYYYGQYFDYWGQGTLLTVSS			117 (SEQ ID NO:2)	
AGP01680	LRAEDTAVYYCARVVGPHLDWGQGTLLTVSS			117 (SEQ ID NO:3)	
Hu5A1VHv1	LRAEDTAVYYCVRYYYGQYFDYWGQGTLLTVSS			117 (SEQ ID NO:4)	
Hu5A1VHv2	LRAEDTAVYYCARVYYGQYFDYWGQGTLLTVSS			117 (SEQ ID NO:5)	

A1

201791711

201791711

A1

АНТИТЕЛА К ТРАНСИРЕТИНУ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Данная заявка относится к предварительной заявке США № 62/109001, поданной 28 января 2015 года, и предварительной заявке США № 62/266557, поданной 11 декабря 2015 года, каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка включает электронный вариант списка последовательностей в файле с именем 473380_SEQLIST.TXT, созданным 28 января 2016 года, и содержащим 70,775 байта, который полностью включен в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Считается, что некоторые заболевания вызваны аномальной сверткой и агрегацией специфических для болезни белков. Эти белки могут собираться в патологические диагностические скопления, известные как амилоиды, которые визуализируются некоторыми гистологическими красителями. Считается, что амилоиды вызывают воспалительные реакции и имеют множество негативных последствий для вовлеченных тканей. Кроме того, могут существовать и оказывать цитотоксическое действие меньшие агрегаты аномально свернутого белка.

[0004] Транстиретин (TTR) является одним из многих белков, которые, как известно, могут неправильно свёртываться и агрегировать (например, подвергаются амилоидогенезу). Связанный с транстиретином амилоидоз включает две формы заболевания: семейное заболевание, возникающее из-за неправильного свертывания мутированного TTR или варианта TTR, а также спорадическое, негенетическое заболевание, вызванное неправильным агрегированием TTR дикого типа. Процесс амилоидогенеза TTR может вызвать патологию в нервной системе и/или сердце, а также в других тканях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте изобретение относится к антителам, которые специфически связывают транстиретин, содержащий три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи по

существо из антитела 6C1. Некоторые такие антитела содержат три CDR тяжелой цепи по Кабату (SEQ ID NO: 10-12 соответственно) и три CDR легкой цепи по Кабату (SEQ ID NO: 18-20 соответственно) антитела 6C1. В некоторых антителах CDR-H1 тяжелой цепи представляет собой составную CDR-H1 по Кабату-Чотиа (SEQ ID NO: 63). Некоторые такие антитела представляют собой моноклональные антитела. Некоторые такие антитела представляют собой химерные, гуманизированные, венеризованные или человеческие антитела. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG1 человека. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG2 или IgG4 человека.

[0006] Некоторые такие антитела являются гуманизированными или химерными антителами 6C1, которые специфически связываются с транстиретином, причем 6C1 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся вариательной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и вариательной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 13.

[0007] В некоторых антителах вариательная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 6C1, а вариательная область гуманизированной зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 6C1. В некоторых антителах вариательная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Кабату 6C1 (SEQ ID NO: 10-12), а вариательная область гуманизированной зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Кабату 6C1 (SEQ ID NO: 18-20).

[0008] В некоторых антителах вариательная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9, а вариательная область гуманизированной зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 17. В некоторых таких антителах позиция H77 занята Т. В некоторых таких антителах позиция H49 занята А. В некоторых таких антителах позиция H76 и H82(a) заняты S. В некоторых таких антителах позиция H49 занята А. В некоторых таких антителах позиции H19, H44, H83 и H89 заняты соответственно К, R, К и М. В некоторых таких антителах позиция H49 занята А. В некоторых таких антителах позиция L45 занята К. В некоторых таких антителах позиция L2 занята V.

[0009] Некоторые антитела содержат вариательную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную

[0011] В некоторых таких антителах переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0013] В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0014] В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0015] В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0016] В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0017] В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0018] В некоторых антителах, антитело представляет собой интактное антитело. В некоторых антителах, антитело представляет собой связывающий фрагмент. В некоторых таких антителах связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab- или Fab'2-фрагмент.

[0019] В некоторых антителах переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, а переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи. В некоторых таких антителах константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму естественной константной области

тяжелой цепи человека, которая имеет ослабленное связывание с рецептором Fc γ относительно естественной константной области тяжелой цепи человека. В некоторых таких антителах константная область тяжелой цепи является таковой изотипа IgG1. В некоторых таких антителах, переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 26, и/или переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 28.

[0020] В некоторых антителах любые различия в CDR переменной области зрелой тяжелой цепи и переменной области зрелой легкой цепи из SEQ ID NO: 1 и 13, соответственно, находятся в позициях H60-H65.

[0021] В другом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из вышеупомянутых антител и фармацевтически приемлемый носитель.

[0022] В другом аспекте, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из вышеупомянутых антител. В другом аспекте, изобретение относится к рекомбинантному вектору экспрессии, содержащему такую нуклеиновую кислоту. В другом аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированной таким рекомбинантным вектором экспрессии.

[0023] В другом аспекте, изобретение относится к способу гуманизации антитела, включающем:

- а) выбор акцепторного антитела;
 - б) идентификацию аминокислотных остатков мышинового антитела, подлежащих сохранению;
 - в) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и
 - г) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для продуцирования гуманизованного антитела;
- причем антитело мыши содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0024] В другом аспекте, изобретение относится к способу изготовления гуманизированного, химерного или венированного антитела, включающему:

а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, так что клетки секретируют антитело; и

б) очистку антитела от клеточной культуральной среды; причем антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 6С1.

[0025] В другом аспекте, изобретение относится к способу изготовления клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело, включающему:

а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела и маркер селекции в клетки;

б) размножение клеток в условиях, позволяющих отбирать клетки, имеющие увеличенное количество копий вектора;

в) выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и

б) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода антитела; причем антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 6С1.

[0026] Некоторые такие способы дополнительно включают размножение клеток в селективных условиях и отбор линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

[0027] В другом аспекте, в изобретении предложен способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

[0028] В другом аспекте, в изобретении предложен способ ингибирования или уменьшения формирования фибрил транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий

введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая накопление транстиретина у субъекта.

[0029] В другом аспекте, в изобретении предложен способ уменьшения количества отложений транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым уменьшая количество отложений транстиретина у субъекта.

[0030] В другом аспекте, в изобретении предложен способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым устраняя агрегаты транстиретина у субъекта по сравнению с субъектом, имеющим транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела.

[0031] В другом аспекте, в изобретении предложен способ стабилизации нетоксичной формы транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым стабилизируя нетоксичную форму транстиретина у субъекта.

[0032] В другом аспекте, в изобретении предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

[0033] В другом аспекте, в изобретении предложен способ замедления начала проявления транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

[0034] В другом аспекте, в изобретении предложен способ диагностирования транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта с эффективным количеством любого из вышеуказанных антител. Некоторые такие способы дополнительно включают обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем присутствие связанного антитела указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

Некоторые такие способы дополнительно включают сравнение связывания антитела с биологическим образцом с связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

[0035] В некоторых таких способах биологический образец и контрольный образец содержат клетки того же самого тканевого происхождения. В некоторых таких способах биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань. В некоторых таких способах твердая ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

[0036] В некоторых способах транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой семейный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз. В некоторых таких способах семейный транстиретиновый амилоидоз является семейной амилоидной кардиомиопатией (FAC), семейной амилоидной полинейропатией (FAP) или селективным амилоидозом центральной нервной системы (CNSA). В некоторых таких способах спорадический транстиретиновый амилоидоз является старческим системным амилоидозом (SSA) или старческим сердечным амилоидозом (SCA).

[0037] В некоторых способах транстиретин-опосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах или желудочно-кишечном тракте субъекта.

[0038] В другом аспекте, в изобретении предложен способ выявления присутствия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта, подозреваемого в наличии амилоидного накопления, с эффективным количеством любого из вышеуказанных антител. Некоторые такие способы дополнительно включают обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстиретина. Некоторые такие способы дополнительно включают сравнение связывания антитела с биологическим образцом с связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз. В некоторых таких способах биологический образец и

контрольный образец содержат клетки того же самого тканевого происхождения. В некоторых таких способах биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань. В некоторых таких способах твердая ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

[0039] В другом аспекте, в изобретении предложен способ выявления количества отложений транстиретина у субъекта, включающий введение любого из вышеупомянутых антител и обнаружения присутствия связанного антитела у субъекта. В некоторых таких способах присутствие связанного антитела определяется позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0040] Фиг. 1 иллюстрирует выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 6C1 мыши, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 6C1. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотиа и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату.

[0041] Фиг. 2 иллюстрирует выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 6C1 мыши, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 6C1. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки.

[0042] Фиг. 3А и 3В: Фиг. 3А иллюстрирует кривую связывания антител 5A1, 6C1, 9D5 и 14G8 мыши с TTR, обработанным pH4. Фиг. 3В иллюстрирует кривую связывания антител 5A1, 6C1, 9D5 и 14G8 мыши с TTR, обработанным pH4, или нативным TTR.

[0043] Фиг. 4А, 4В и 4С: фиг. 4А иллюстрирует ингибирование образования фибрилл TTR-Y78F с помощью антител к mis-TTR. Фиг. 4В иллюстрирует ингибирование образования фибрилл TTR-V122I с помощью антитела 14G8. Фиг. 4С иллюстрирует ингибирование образования фибрилл TTR-V122I контрольным антителом.

[0044] Фиг. 5А и 5В: Фиг. 5А иллюстрирует анализ оптической плотности Вестерн-блот анализа образцов плазмы от пациентов, для которых подтвержден V30M ATTR (образец № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20) и образцов от субъектов с нормальным

состоянием (образец № 21, № 22, № 23, № 24, № 25 и № 27), с применением антитела 9D5 к mis-TTR. Фиг. 5B иллюстрирует анализ оптической плотности Вестерн-блот анализа тех же образцов с применением антитела 5A1 mis-TTR.

[0045] Фиг. 6 иллюстрирует плащечный анализ MesoScale Discovery (MSD) образцов плазмы от пациентов с подтвержденным V30M ATTR (образец № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20) и образцов от субъектов с нормальным состоянием (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27), с применением антитела 6C1.

[0046] Фиг. 7A и 7B: Фиг. 7A иллюстрирует эффект антитела 14G8 на поглощение TTR с F87M/L110M клетками THP-1. Фиг. 7B иллюстрирует эффект каждого антитела к mis-TTR на поглощение TTR с V30M клетками THP-1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0047] SEQ ID NO: 1 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела 6C1 мыши.

[0048] SEQ ID NO: 2 указана как аминокислотная последовательность шаблона структуры вариательной области тяжелой цепи мыши.

[0049] SEQ ID NO: 3 указана как аминокислотная последовательность вариательного акцептора тяжелой цепи с идентификационным номером ADX65650.

[0050] SEQ ID NO: 4 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1).

[0051] SEQ ID NO: 5 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи варианта 1b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1b).

[0052] SEQ ID NO: 6 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2).

[0053] SEQ ID NO: 7 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи варианта 2b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2b).

[0054] SEQ ID NO: 8 указана как аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи варианта 3 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv3).

[0055] SEQ ID NO: 9 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 3b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv3b).

[0056] SEQ ID NO: 10 указана как аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0057] SEQ ID NO: 11 указана как аминокислотная последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0058] SEQ ID NO: 12 указана как аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0059] SEQ ID NO: 13 указана как аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 6C1 мыши.

[0060] SEQ ID NO: 14 указана как аминокислотная последовательность шаблона структуры варибельной области легкой цепи мыши.

[0061] SEQ ID NO: 15 указана как аминокислотная последовательность варибельного акцептора легкой цепи с идентификационным номером ABI74084.

[0062] SEQ ID NO: 16 указана как аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VLv1).

[0063] SEQ ID NO: 17 указана как аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VLv2).

[0064] SEQ ID NO: 18 указана как аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0065] SEQ ID NO: 19 указана как аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0066] SEQ ID NO: 20 указана как аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 6C1 мыши.

[0067] SEQ ID NO: 21 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 6C1 мыши с сигнальным пептидом.

[0068] SEQ ID NO: 22 указана как аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 6C1 мыши с сигнальным пептидом.

[0069] SEQ ID NO: 23 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела 6C1 мыши с сигнальным пептидом.

[0070] SEQ ID NO: 24 указана как аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 6C1 мыши с сигнальным пептидом.

[0071] SEQ ID NO: 25 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области тяжелой цепи IgG1.

[0072] SEQ ID NO: 26 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области тяжелой цепи IgG1 G1m3.

[0073] SEQ ID NO: 27 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области тяжелой цепи IgG1 G1m3.

[0074] SEQ ID NO: 28 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области легкой цепи с С-концевым аргинином.

[0075] SEQ ID NO: 29 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области легкой цепи без С-концевого аргинина.

[0076] SEQ ID NO: 30 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1.

[0077] SEQ ID NO: 31 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 1b гуманизированного антитела 6C1.

[0078] SEQ ID NO: 32 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1.

[0079] SEQ ID NO: 33 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 2b гуманизированного антитела 6C1.

[0080] SEQ ID NO: 34 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 3 гуманизированного антитела 6C1.

- [0081]** SEQ ID NO: 35 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 3b гуманизированного антитела 6C1.
- [0082]** SEQ ID NO: 36 указана как аминокислотная последовательность области легкой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1.
- [0083]** SEQ ID NO: 37 указана как аминокислотная последовательность области легкой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1.
- [0084]** SEQ ID NO: 38 указана как аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под идентификационным номером P02766.1 (UniProt).
- [0085]** SEQ ID NO: 39 указана как аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под идентификационным номером AAB35639.1 (GenBank).
- [0086]** SEQ ID NO: 40 указана как аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под идентификационным номером AAB35640.1 (GenBank).
- [0087]** SEQ ID NO: 41 указана как аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под идентификационным номером ABI63351.1 (GenBank).
- [0088]** SEQ ID NO: 42 указана как аминокислотная последовательность остатков 89-97 транстиретина человека.
- [0089]** SEQ ID NO: 43 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстиретинового иммуногена.
- [0090]** SEQ ID NO: 44 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстиретинового иммуногена.
- [0091]** SEQ ID NO: 45 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстиретинового иммуногена.
- [0092]** SEQ ID NO: 46 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область тяжелой цепи IgG1 G1m3.
- [0093]** SEQ ID NO: 47 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область легкой цепи с С-концевым аргинином.

- [0094]** SEQ ID NO: 48 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область легкой цепи без C-концевого аргинина.
- [0095]** SEQ ID NO: 49 указана как аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области тяжелой цепи.
- [0096]** SEQ ID NO: 50 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области тяжелой цепи.
- [0097]** SEQ ID NO: 51 указана как аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области легкой цепи.
- [0098]** SEQ ID NO: 52 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области легкой цепи.
- [0099]** SEQ ID NO: 53 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи 6C1 мыши.
- [00100]** SEQ ID NO: 54 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи 6C1 мыши.
- [00101]** SEQ ID NO: 55 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1).
- [00102]** SEQ ID NO: 56 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 1b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1b).
- [00103]** SEQ ID NO: 57 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2).
- [00104]** SEQ ID NO: 58 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 2b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2b).

[00105] SEQ ID NO: 59 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 3 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv3).

[00106] SEQ ID NO: 60 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 3b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv3b).

[00107] SEQ ID NO: 61 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VLv1).

[00108] SEQ ID NO: 62 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VLv2).

[00109] SEQ ID NO: 63 указана как аминокислотная последовательность совмещенной CDR-H1 (остатки 26-35) антитела 6C1 мыши.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00110] Моноклональные антитела или другие биологические объекты обычно предоставляются в выделенной форме. Это означает, что антитело или другой биологический объект обычно является по меньшей мере на 50% мас./мас. чистым от мешающих белков и других загрязнителей, возникающих в результате его получения или очистки, но не исключает возможности смешивания моноклонального антитела с избыточным количеством фармацевтически приемлемого носителя(-лей) или другого переносчика, предназначенного для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас. чистыми от мешающих белков и загрязняющих веществ, возникающих в результате производства или очистки. Часто, выделенное моноклональное антитело или другой биологический объект является преобладающим макромолекулярным видом, оставшимся после его очистки.

[00111] Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном означает аффинность, составляющая по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , или 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание является более обнаруживаемым по значению, и отличается от неспецифического связывания, случающегося, по меньшей мере, с одной посторонней

мишенью. Специфическое связывание может быть результатом формирования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной подгонки (например, тип «замок и ключ»), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом ван-дер-ваальсовых сил. Однако, специфическое связывание не обязательно означает то, что антитело связывает одну и только одну мишень.

[00112] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область длиной примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в основном отвечающих за распознавание антигена. Данная вариабельная область в первоначальном экспрессированном виде связана с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельная область без сигнального пептида иногда упоминается как зрелая вариабельная область. Так, например, зрелая вариабельная область легкой цепи обозначает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом отвечающую за эффекторную функцию.

[00113] Легкие цепи делят на каппа и лямбда. Тяжелые цепи разделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и выделяют такие изотипы антитела как: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельная и константная области соединяются областью «J», длиной около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область «D», включающая около 10 или более аминокислот. Смотрите в целом, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (включен в полном объеме посредством ссылки для всех целей).

[00114] Вариабельная область легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (также называемая в данном документе «вариабельный домен легкой цепи» («домен VL») или «вариабельный домен тяжелой цепи» («домен VH»), соответственно) состоит из «каркасной» области, прерывающейся тремя «областями, определяющими комплементарность» или «CDR». Каркасные области используют для выравнивания CDR по специфическому связыванию с эпитопом антигена. CDR содержат аминокислотные остатки антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От аминоконца до карбоксиконца оба домена VL и VH содержат следующие каркасные (FR - framework) и CDR области: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-L1, CDR-L2

и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3.

[00115] Обозначение аминокислот для каждого домена VL и VH соответствует любому обычному определению CDR. Обычные определения включают определение по Кабату *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), определения по Чотиа (Chothia & Lesk, *J. Mol.* 196: 901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342: 878-883, 1989); совмещенное определение для CDR по Чотиа-Кабату, в котором CDR-H1 является совмещенными CDR по Чотиа и Кабату; определение AbM, используемое программным обеспечением для моделирования антител Oxford Molecular; и контактное определение Мартина и соавторов (bioinfo.org.uk/abs) (см. Таблицу 1). Кабат предлагает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация Кабата), в котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковое число. Когда указывается, что антитело содержит CDR по некоторым определением CDR (например, Кабату), это определение указывает минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т. е. CDR по Кабату). Это не исключает того, что также присутствуют другие остатки, попадающие в другое общепринятое определение CDR, но они находятся вне указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные по Кабату, включает среди других вариантов, антитело, в котором CDR содержат остатки CDR по Кабату и не содержат других остатков CDR, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой составной CDR H1 по Чотиа-Кабату и другие CDR содержат остатки CDR по Кабату, и никаких дополнительных остатков CDR на основе других определений.

Таблица 1

Общепринятые определения CDR с использованием нумерации Кабата

Петля	По Кабату	По Чотиа	Составное по Чотиа и по Кабату	AbM	По контакту
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*CDR-H1 по Чотиа может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что в схеме нумерации Кабата размещают вставки дополнительных остатков в 35A и 35B, тогда как в нумерации Чотиа их размещают в 31A и 31B. Если не представлено ни H35A, ни H35B (нумерация Кабата), петля CDR-H1 по Чотиа заканчивается на H32. Если есть только H35A, она заканчивается на H33. Если присутствуют и H35A и H35B, она заканчивается на H34.

[00116] Термин «антитело» включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Dabs, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть продуцированы с помощью методов рекомбинантной ДНК, или путем ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин «антитело» также включает биспецифическое антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифических антителах две различные пары тяжелых/легких цепей включают пару тяжелая цепь/легкая цепь гуманизированного 6C1 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстретине, чем тот, что связан антителом 6C1.

[00117] В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизированное антитело 6C1, как дополнительно описано ниже, а другая пара тяжелая цепь/легкая цепь из антитела, которое связывается с рецептором, экспрессируемым на гематоэнцефалическом барьере, таким как рецептор инсулина, рецептор инсулин-подобного фактора (IGF - insulin-like growth factor), рецептор лептина или рецептор липопротеинов или рецептор трансферрина (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифическое антитело может быть перенесено через гематоэнцефалический барьер посредством рецептор-опосредованного трансцитоза. Поглощение мозгом биспецифического антитела может быть дополнительно усилено путем проектирования биспецифического антитела для снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводит к более широкому распространению в мозге (см., например, Atwal *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

[00118] Примерами биспецифических антител также могут быть: 1) антитело с двойным варибельным доменом (DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два варибельных домена в тандеме посредством короткого пептидного соединения (Wu *et al.*, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) тандаб (Tandab), которое представляет собой гибрид двух одноцепочечных диател, образующих четырехвалентное биспецифическое антитело, которое имеет два сайта связывания для каждого из целевых антигенов; 3) флекситело, которое представляет собой совмещение scFvs с диателом, приводящее к образованию многовалентной молекулы; 4) так называемая молекула «dock and lock», созданная на основе «домена димеризации и докинга» протеинкиназы A, применение которого с Fab приводит к получению биспецифического трехвалентного связывающего белка, состоящего из двух идентичных Fab-фрагментов, присоединённых к другому Fab-фрагменту; (5) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, слитых с обоими концами Fc-области антитела человека. Примеры платформ, полезных для приготовления биспецифических антител, включают: BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab и Mab2 (F-star), Fc-спроектированный IgG1 (Xencor) или DuoBody (на основе обмена плечей Fab, Genmab).

[00119] Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть сформирован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сближающихся посредством третичного свертывания одного или

нескольких белков. Эпитопы, сформированные из смежных аминокислот (также известные как линейные эпитопы), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, сформированные путем третичного свертывания (также известные как конформационные эпитопы), обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а более обычно - по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. Смотрите, например, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Эпитоп может быть линейным, таким как эпитоп, например, 2-5, 3-5, 3-9 или 5-9 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 38. Эпитоп также может быть конформационным эпитопом, содержащим, например, два или более несмежных сегмента аминокислот в пределах остатков 89-97 SEQ ID NO: 38. Если говорят, что антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот 89-97 транстиретина (TTR), например, то подразумевается, что эпитоп находится в пределах описанного промежутка аминокислот, включая те, которые определяют внешние пределы промежутка. Это не обязательно означает, что каждая аминокислота в пределах промежутка составляет часть эпитопа. Так, например, эпитоп в пределах аминокислот 89-97 TTR может состоять из аминокислот 89-97, 89-96, 90-96, 91-96, 92-96, 93-96, 94-96, 89-96, 89-95, 89-94, 89-93, 89-92 или 89-93 среди других линейных сегментов SEQ ID NO: 42, или в случае конформационных эпитопов, несмежных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 42.

[00120] Антитела, которые распознают одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы в простом иммуноанализе, показывающем способность одного антитела конкурировать с другим антителом за связывание с целевым антигеном. Эпитоп антитела также может быть определен рентгеновской кристаллографией антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактирующих остатков. В альтернативном варианте, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, также уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, также уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

[00121] Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере, 2х, 5х, 10х, 20х или 100х) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, как измерено при анализе конкурентного связывания. Некоторые тестируемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75%, 90% или 99%. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, находящимся достаточно проксимально по отношению к эпитопу, связанному эталонным антителом для создания стерического препятствия.

[00122] Термин «нативный» по отношению к структуре транстиретина (TTR) относится к нормально свернутой структуре TTR в его правильно функционирующем состоянии (т. е. тетрамер TTR). Поскольку TTR является тетрамером в его изначально свернутой форме, неродные формы TTR включают, например, неправильно свернутые тетрамеры TTR, мономеры TTR, агрегированные формы TTR, и TTR в форме фибрилл. Неродные формы TTR могут включать молекулы, содержащие аминокислотные последовательности TTR дикого типа или мутации.

[00123] Термин «неправильно свернутый» по отношению к TTR относится к вторичной и третичной структуре полипептидного мономера или мультимера TTR и указывает на то, что полипептид принял конформацию, которая не является нормальной для этого белка в его правильно функционирующем состоянии. Хотя неправильное свертывание TTR может быть вызвано мутациями в белке (например, делецией, заменой или добавлением), белки TTR дикого типа также могут быть неправильно свернуты при заболеваниях, экспонируя специфические эпитопы.

[00124] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, эксципиент или вспомогательное вещество совместимо с другими ингредиентами состава и не является по существу вредным для его реципиента.

[00125] Термин «пациент» включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[00126] Человек подвержен повышенному риску заболевания, если у субъекта есть хотя бы один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и ситуационный риск), в результате чего люди с этим фактором риска имеют статистически значимый больший риск развития заболевания чем люди без фактора риска.

[00127] Термин «биологический образец» относится к образцу биологического материала внутри биологического источника или который может быть получен из источника, например, человека или млекопитающего. Такие образцы могут быть органами, органеллами, тканями, срезами тканей, физиологическими жидкостями, периферической кровью, плазмой крови, сывороткой крови, клетками, молекулами, такими как белки и пептиды, и любыми полученными из них частями или комбинациями. Термин биологический образец может также охватывать любой материал, полученный путем обработки образца. Производный материал может включать клетки или их потомство. Обработка биологического образца может включать одну или несколько фильтратий, дистилляций, экстракций, концентрирований, фиксаций, инактиваций мешающих компонентов, и тому подобного.

[00128] Термин «контрольный образец» относится к биологическому образцу, для которого не известно или не подозревается содержание мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм транстиретина (TTR), например, таких как в амилоидных отложениях TTR. Контрольные образцы могут быть получены у лиц, не страдающих TTR-амилоидозом или специфически выбранным типом TTR-амилоидоза. Альтернативно, контрольные образцы могут быть получены у пациентов, страдающих TTR-амилоидозом или специфически выбранным типом TTR-амилоидоза. Такие образцы могут быть получены в то же время, что и биологический образец, который, как считается, содержит TTR-амилоидоз, или в другом случае. Биологический образец и контрольный образец могут быть получены из одной и той же ткани (например, срез ткани, содержащий как отложения амилоида TTR, так и окружающие нормальные ткани). Предпочтительно контрольные образцы состоят в основном или полностью из ткани, свободной от амилоидных отложений TTR, и могут быть использованы для сравнения с биологическим образцом, который, как считается, содержит амилоидные отложения TTR. Предпочтительно ткань в контрольном образце имеет тот же самый тип, что и ткань в биологическом образце (например, кардиомиоциты в сердце).

[00129] Термин «болезнь» относится к любому аномальному состоянию, которое ухудшает физиологическую функцию. Этот термин широко используется для охвата любого расстройства, хвори, аномалии, патологии, недуга, состояния или синдрома, при которых нарушается физиологическая функция, независимо от характера этиологии.

[00130] Термин «симптом» относится к субъективным свидетельствам заболевания, таким как измененная походка, как это воспринимается субъектом. «Признак» относится к объективным свидетельствам болезни, наблюдаемых врачом.

[00131] Для классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные, аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены подразумевают замены между аминокислотами в одном классе. Неконсервативные замены заключаются в обмене члена одного из этих классов на член другого.

[00132] Идентичность последовательности в процентах определяется с помощью последовательностей антител, максимально выравненных согласно соглашению нумерации Кабата. После выравнивания, если область антитела субъекта (например, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с той же областью эталонного антитела, то идентичность последовательности в процентах между областями субъекта и эталонного антитела представляет собой число позиций, занятых такой же аминокислотой как в области субъекта, так и в области эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных позиций двух областей, причем промежутки не учитываются, умноженное на 100 для преобразования в процент выражение.

[00133] Композиции или способы, «содержащие» или «включающие» один или несколько рассмотренных элементов, могут включать другие элементы, которые не были точно указаны. Например, композиция, которая «содержит» или «включает» антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими составляющими.

[00134] Обозначение диапазона значений включает все целые числа в пределах диапазона или задающие диапазон, и все поддиапазоны, заданные целыми числами в пределах диапазона.

[00135] Если иное не вытекает из контекста, термин «около» охватывает значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, SEM) указанного значения.

[00136] Статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

[00137] Формы существительных в единственном числе включают также формы в множественном числе, до тех пор, пока иное четкое не следует из контекста. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» может включать в себя множество соединений, включая их смеси.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Общие положения

[00138] В изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с остатками 89-97 транстиретина (TTR). Антитела обладают способностью связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами TTR. Антитела могут быть использованы для лечения, или осуществления профилактики заболеваний или расстройств, связанных с накоплением TTR или накоплением отложений TTR (например, TTR-амилоидоза). Антитела также могут быть использованы для диагностики TTR-амилоидоза и ингибирования, или уменьшения агрегации TTR, среди других применений.

II. Молекулы-мишени

[00139] Транстиретин (TTR) представляет собой сывороточный белок и транспортный белок спинномозговой жидкости, имеет длину 127 аминокислот, массу 55 кДа и синтезируется в основном печенью. Он также упоминается как преальбумин, тироксинсвязывающий преальбумин, ATTR (TTR amyloidosis) и TBPA (thyroxine-binding prealbumin - тироксин-связывающий преальбумин). В своем нативном состоянии TTR существует как тетрамер. У гомозигот тетрамеры содержат идентичные 127-аминокислотные субъединицы, богатые на бета-слои. У гетерозигот тетрамеры TTR состоят из различных субъединиц и/или субъединиц дикого типа, которые обычно объединяются статистическим способом.

[00140] Установленная функция TTR в крови заключается в транспорте *holo*-ретинолсвязывающего белка. Хотя TTR является основным переносчиком тироксина (T₄) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам,

используемым для *holo*-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания T₄ фактически незаняты у людей.

[00141] TTR является одним из, по меньшей мере, тридцати различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразие агрегатных структур, как полагают, вызывают дегенеративные заболевания, называемые амилоидными заболеваниями. TTR должен претерпеть конформационные изменения, чтобы стать амилоидогенным. Частичное разворачивание раскрывает участки почти незаряженных гидрофобных остатков в развернутой конформации, которые успешно неправильно собираются в почти полностью неструктурированные сферические агрегаты, которые в конечном итоге претерпевают конформационное преобразование в амилоидные структуры с бета-листами.

[00142] Если иное не очевидно из контекста, отсылка к транстиретину (TTR) или его фрагментам или доменам включает природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутантные и аллельные варианты. Иллюстративные полипептидные последовательности TTR обозначаются номерами доступа P02766.1 (UniProt) (SEQ ID NO: 38), AAB35639.1 (GenBank) (SEQ ID NO: 39), AAB35640.1 (GenBank) (SEQ ID NO: 40), и ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NO: 41). Остатки нумеруются в соответствии с P02766.1 Swiss Prot, с первой аминокислотой зрелого белка (то есть, не включая 20-аминокислотную сигнальную последовательность), обозначенной остатком 1. В любом другом белке TTR остатки нумеруются согласно соответствующим остаткам в P02766.1 при максимальном выравнивании.

III. Транстиретиновый амилоидоз

[00143] Транстиретиновый (TTR) амилоидоз представляет собой системное расстройство, характеризующееся патогенным, неправильным свернутым TTR и внеклеточным отложением амилоидных фибрилл, состоящих из TTR. TTR-амилоидоз обычно вызван дестабилизацией нативной тетрамерной формы TTR (из-за условий среды или генетических патологий), что приводит к диссоциации, неправильному свертыванию и агрегации TTR в амилоидные фибриллы, которые накапливаются в различных органах и тканях, вызывая прогрессирующую дисфункцию. Смотрите, например, Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

[00144] У людей, как тетрамеры TTR дикого типа, так и смешанные тетрамеры, состоящие из субъединиц мутантного и дикого типа, могут диссоциировать, неправильно свертываться и агрегировать, причем процесс амилоидогенеза приводит к дегенерации постмитотической ткани. Таким образом, TTR-амилоидозы включают заболевания, вызванные патогенным неправильно свернутым TTR, возникающим в результате мутаций в TTR, или возникающим из не мутированного, неправильно свернутого TTR.

[00145] Например, старческий системный амилоидоз (SSA - senile systemic amyloidosis) и старческий сердечный амилоидоз (SCA - senile cardiac amyloidosis) представляют собой возрастные типы амилоидоза, которые возникают в результате отложения амилоида TTR дикого типа за пределами и внутри кардиомиоцитов сердца. TTR амилоидоз также является наиболее распространенной формой наследственного (семейного) амилоидоза, который вызван мутациями, которые дестабилизируют белок TTR. Амилоидозы TTR, связанные с точечными мутациями в гене TTR, включают семейную амилоидную полиневропатию (FAP - familial amyloid polyneuropathy), семейную амилоидную кардиомиопатию (FAC - familial amyloid cardiomyopathy) и редкий избирательный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA - central nervous system selective amyloidosis). Пациенты с наследственным (семейным) TTR-амилоидозом почти всегда являются гетерозиготами, что означает, что тетрамеры TTR состоят из субъединиц TTR мутантного и/или дикого типа, в целом, как правило, статистически распределенных. Наследственные (семейные) формы TTR-амилоидоза, как правило, являются аутосомно-доминантными и, как правило, имеют более раннее проявление первых симптомов, чем спорадические заболевания (SSA и SCA).

[00146] В гене, кодирующем TTR, более 100 мутаций которые связывают с аутосомно-доминантными расстройствами FAP и FAC. Смотрите, например, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet and Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983). Эти мутации, вызывающие образование амилоида, распределены по всей молекуле TTR. Как правило, чем более дестабилизирующими для тетрамерной структуры TTR являются мутантные субъединицы, тем раньше проявляются первые симптомы амилоидного заболевания. Патогенный потенциал варианта TTR в целом, как правило, определяется комбинацией его нестабильности и эффективности его клеточной секреции. Первоначальная патология, вызванная некоторыми вариантами TTR, является результатом их избирательного разрушения сердечной ткани, тогда как другие варианты TTR приводят к нарушениям в периферической и вегетативной нервной системах. Повреждение ткани, вызванное

амилоидогенезом TTR, по-видимому, обусловлено главным образом токсичностью небольших, диффундирующих агрегатов TTR, хотя накопление внеклеточного амилоида может способствовать и почти наверняка приводит к изменению структуры органа на поздних стадиях TTR-амилоидоза.

[00147] TTR-амилоидоз представлен многими различными формами, со значительными фенотипическими различиями между индивидами и географическими регионами. Например, TTR-амилоидоз может представлять собой прогрессирующую, аксональную сенсорную вегетативную и моторную невропатию. TTR-амилоидоз может также представлять собой проникающую кардиомиопатию.

[00148] Возраст проявления первых симптомов, связанных с болезнью, колеблется между вторым и девятым десятилетиями жизни с большими вариациями в разных популяциях. Мультисистемное поражение TTR-амилоидозом является ключом к его диагностике. Например, диагноз TTR-амилоидоза рассматривается при наличии одного или нескольких следующих факторов: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) невропатическая боль или прогрессирующие сенсорные нарушения неизвестной этиологии; 3) синдром кистевого туннеля без очевидной причины, особенно если он двусторонний и требует хирургического устранения; 4) нарушения моторики желудочно-кишечного тракта или дисфункция автономной нервной системы неизвестной этиологии (например, эректильная дисфункция, ортостатическая гипотензия, нейрогенный голод); 5) сердечная болезнь, характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атрио-вентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Другие симптомы могут включать, например, полинейропатию, потерю чувствительности, боль, слабость нижних конечностей, дисгидроз, диарею, запор, потерю веса и недержание/удержание мочи.

[00149] Диагностика TTR-амилоидоза обычно опирается на биопсию органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя Congo red. Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание для TTR, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является TTR. Для семейных форм заболеваний необходимо

продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем TTR, до постановки диагноза. Это может быть достигнуто, например, посредством изоэлектрического фокусирующего электрофореза, полимеразной цепной реакции или лазерной диссекции/жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией. См., например, US 2014/0056904; Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

IV. Антитела

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[00150] В изобретении предложены моноклональные антитела, связывающиеся с белком транстиретином (TTR), более конкретно, с эпитопами в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 42) белка TTR. Такие эпитопы являются скрытыми в нативном тетрамере TTR, и экспонированы в мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных формах TTR.

[00151] Антитело, обозначенное как 6C1, является таким иллюстративным мышинным антителом. Это антитело специфически связывается в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 42) белка TTR. Данное антитело дополнительно характеризуется его способностью связываться с мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами TTR, но не с нативными тетрамерными формами TTR. Кроме того, данное антитело характеризуется иммунореактивностью к сердечной ткани, подверженной TTR-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой сердечной ткани. Способность связываться с конкретными белками или их фрагментами может быть продемонстрирована с использованием иллюстративных форматов анализа, представленных в примерах.

[00152] Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом что и антитело, обозначенное как 6C1. Последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и легкой цепей 6C1 обозначены как SEQ ID NO: 1 и 13, соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей с помощью TTR или его части, включая желаемый эпитоп (например, SEQ ID NO: 42), и путем скрининга полученных антител на связывание с мономерным TTR или пептидом, содержащим SEQ ID NO: 42, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим вариабельные области антитела мыши 6C1 (IgG1, каппа). Фрагменты TTR, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем,

который помогает вызывать гуморальный ответ на фрагмент, и/или смешаны с адъювантом, который помогает вызвать такой ответ. Такие антитела могут быть проверены на различие в связывании с мономерными вариантами TTR, вариантом дикого типа или фрагментом TTR (например, SEQ ID NO: 38) по сравнению с мутантами по указанным остаткам. Скрининг при сравнении с такими мутантами более точно определяет специфичность связывания, что позволяет идентифицировать антитела, связывание которых ингибируется мутагенезом определенных остатков и которые, вероятно, будут обладать функциональными свойствами других иллюстративных антител. Мутации могут быть систематической замещающей заменой аланином (или серином, если уже присутствует аланин), по одному остатку за раз, или заменой более широкими интервалами по всей мишени или по всему её участку, в котором, как известно, находится эпитоп. Если один и тот же набор мутаций значительно снижает связывание двух антител, оба антитела связывают один и тот же эпитоп.

[00153] Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 6C1), также могут быть получены с использованием варианта способа фагового дисплея. См. Winter, WO 92/20791. Этот способ особенно подходит для продуцирования человеческих антител. В этом способе в качестве исходного материала используют переменную область или тяжелой, или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, то создают библиотеку фагов, в которой элементы отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (то есть исходный материал мыши) и другую переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки перегруппированных переменных областей тяжелой цепи человека. Отбирается фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание (например, по меньшей мере 10^8 , а предпочтительно, по меньшей мере, 10^9 M^{-1}) для мономера TTR или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97). Переменная область тяжелой цепи из этого фага затем служит в качестве исходного материала для конструирования дополнительной библиотеки фагов. В этой библиотеке каждый фаг отображает ту же самую переменную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплей-библиотеки), и другую переменную область легкой цепи. Переменные области легкой цепи могут быть получены, например, из библиотеки перегруппированных переменных областей легкой цепи человека. Опять же, выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание для мономерного TTR или его фрагмента (например, аминокислотных

остатков 89-97). Полученные антитела обычно имеют такую же или сходную специфичность к эпитопу, что и исходный материал мышцы.

[00154] Другие антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 6C1. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны антителу 6C1 по аминокислотной последовательности переменных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепи, и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну или все шесть CDR, как определено в соответствии с общепринятым соглашением, но предпочтительно по Кабату, которые являются на 90%, 95%, 99% или 100% идентичными соответствующим CDR антитела 6C1.

[00155] В изобретении также предложены антитела, имеющие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR полностью или практически полностью из 6C1. Такие антитела могут содержать переменную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из переменной области тяжелой цепи антитела 6C1, и/или переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из переменной области легкой цепи антитела 6C1. Антитела могут также включать как тяжелые, так и легкие цепи. CDR является почти полностью взятой из соответствующей CDR антитела 6C1, когда она содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций, за исключением того, что CDR-H2 (когда определено по Кабату) может иметь не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций. Такие антитела могут иметь по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с антителом 6C1 по аминокислотной последовательности переменных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепи(-ей), и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от антитела 6C1 небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок.

[00156] Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами TTR, но не с нативными тетрамерными формами TTR, как

описано в примерах или где либо еще. Аналогично, некоторые антитела являются иммунореактивными к ткани, подверженной TTR-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой ткани.

[00157] Некоторые антитела могут ингибировать или уменьшать агрегацию TTR, ингибировать или уменьшать образование фибрилл TTR, уменьшать или удалять отложения TTR либо агрегированный TTR, или стабилизировать нетоксичные конформации TTR в животной модели или клинических испытаниях. Некоторые антитела могут лечить, оказывать профилактическое действие или замедлять начало проявления первых симптомов TTR-амилоидоза, как показано в животной модели или клинических испытаниях. Иллюстративные модели животных для тестирования активности против TTR-амилоидоза включают те, которые описаны в Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Teng *et al.*, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001); Wakasugi *et al.*, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987); Shimada *et al.*, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989); Nagata *et al.*, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995); Sousa *et al.*, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002); и Santos *et al.*, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010).

В. Нечеловеческие антитела

[00158] Производство других нечеловеческих антител, например антител мыши, морской свинки, приматов, кроликов или крыс, к мономерному TTR или его фрагменту (например, аминокислотных остатков 89-97) может быть осуществлено, например, путем иммунизации животного TTR или его фрагментом. Смотрите Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включено посредством ссылки для всех целей). Такой иммуноген может быть получен из природного источника, путем пептидного синтеза или экспрессией рекомбинантного пептида. Необязательно, иммуноген можно вводить слитым или иным образом совмещенным с белком-носителем. Необязательно, иммуноген можно вводить с адъювантом. Могут быть использованы несколько типов адъювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адъювант Фрейнда, после которого применяют неполный адъювант. Кролики или морские свинки обычно используются для получения поликлональных антител. Мышей обычно используют для продуцирования моноклональных антител. Антитела скринируют на специфическое связывание с мономерным TTR или эпитопом в TTR (например, эпитопом, содержащим один или несколько аминокислотных остатков 89-97). Такой скрининг может быть осуществлен путем определения связывания антитела с набором мономерных вариантов TTR, таких как

варианты TTR, содержащие аминокислотные остатки 89-97 или мутации в пределах этих остатков, и путем определения того, какие варианты TTR связываются с антителом. Связывание может быть оценено, например, Вестерн-блоттингом, FACS (Flow Cytometry Staining Protocol) или твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

С. Гуманизированные антитела

[00159] Гуманизированное антитело представляет собой генетически модифицированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого «донорного» антитела переносят в последовательности «акцепторного» антитела человека (см., например, Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; and Foote, US 6,881,557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, составную последовательность из таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека, или последовательность из клеток зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR полностью или почти полностью из донорных антител, и каркасные последовательности вариабельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или почти полностью из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или почти полностью из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса вариабельной области тяжелой цепи человека и последовательностей константной области. Схожим образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или почти полностью из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса вариабельной области легкой цепи человека и последовательностей константной области. Помимо нанотел и dAbs, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе является почти полностью из соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определено по Кабату) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности вариабельной области цепи

антитела или константной области цепи антитела являются почти полностью из каркасной последовательности вариабельной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определенные по Кабату, являются идентичными.

[00160] Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (определены предпочтительно по Кабату) из антитела мыши, они также могут быть сделаны с меньшим, чем все CDR, количеством (например, по меньшей мере тремя, четырьмя или пятью CDR) из антитела мыши (например, Pascalis *et al.*, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura *et al.*, *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

[00161] В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не входящие в SDR, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не требуются), на основании областей CDR по Кабату, расположенных вне гипервариабельных петель по Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в позициях, в которых отсутствует один или несколько донорных CDR-остатков, или в которых отсутствует весь донорный CDR, аминокислота, занимающая позицию, может быть аминокислотой, занимающей соответствующую позицию (по нумерации Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцептора для донорных аминокислот в CDR что должны быть включены, отражают баланс конкурирующих предпочтений. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замены могут также вызывать изменения аффинности, и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Также могут быть выбраны эмпирически заменяемые позиции в пределах CDR, и аминокислоты для замены.

[00162] Последовательности акцепторного антитела человека могут быть необязательно выбраны из многих известных последовательностей антител человека для того, чтобы обеспечить высокую степень идентичности последовательности (например, идентичность

65-85%) между каркасами варибельной области последовательности акцептора человека и соответствующими каркасами варибельной области цепи донорного антитела.

[00163] Примером последовательности акцептора для тяжелой цепи является варибельная область зрелой тяжелой цепи человека с идентификационным номером NCBI - ADX65650 (SEQ ID NO:3). Эта акцепторная последовательность содержит две CDR, имеющих ту же традиционную форму, что и в тяжелой цепи 6C1 мыши. Примером акцепторной последовательности для легкой цепи является варибельная область зрелой легкой цепи человека с идентификационным номером NCBI ABI74084 (SEQ ID NO: 15). Данная акцепторная последовательность содержит две CDR, имеющих ту же традиционную форму, что и в легкой цепи 6C1 мыши.

[00164] Могут быть выбраны определенные аминокислоты из остатков в каркасе варибельной области человека для замены, исходя из их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывания с антигеном. Исследование таких возможных влияний заключается в моделировании, изучении характеристик аминокислот в определенных местах, или эмпирическом наблюдении эффектов замены или мутагенеза определенных аминокислот.

[00165] Например, когда аминокислота различается между каркасным остатком варибельной области мыши и выбранным каркасным остатком варибельной области человека, аминокислота в человеческом каркасе может быть замещена эквивалентной каркасной аминокислотой из мышинового антитела, если разумно ожидать, что аминокислота:

- 1) нековалентно прямо связывается с антигеном;
- 2) является смежной с областью CDR или находится внутри CDR, как определено по Чотиа, но не по Кабату;
- 3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 Å области CDR) (например, идентифицируется путем моделирования легкой или тяжелой цепи на решенной структуре гомологичной известной цепи иммуноглобулина); или
- 4) представляет собой остаток, размещенный в интерфейсе VL-VH.

[00166] Аминокислотные остатки каркаса из классов 1) - 3), как определено Queen, US 5530101, иногда поочередно упоминаются как канонические и верниальные (vernier) остатки. Аминокислотные остатки каркаса, которые помогают определить конформацию

петли CDR, иногда упоминаются как канонические остатки (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). Аминокислотные остатки каркаса, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют определенную роль в тонкой подгонки антитела к антигену, иногда упоминаются как верниальные остатки (vernier residues) (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

[00167] Другими остатками каркаса, которые представляют собой кандидаты на замену, являются остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Другими кандидатами на замещение являются каркасные аминокислоты акцептора человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этом положении. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентной позиции донорного антитела мыши, или из эквивалентных позиций более типичных человеческих иммуноглобулинов.

[00168] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы антитела 6C1 мыши, обозначенного Hu6C1. Антитело мыши содержит переменные области зрелых тяжелой и легкой цепей, имеющих аминокислотные последовательности, включающие SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 13, соответственно. В изобретении предложены шесть иллюстративных переменных областей гуманизированной зрелой тяжелой цепи: Hu6C1VHv1 (SEQ ID NO: 4), Hu6C1VHv1b (SEQ ID NO: 5), Hu6C1VHv2 (SEQ ID NO: 6), Hu6C1VHv2b (SEQ ID NO: 7), Hu6C1VHv3 (SEQ ID NO: 8) и Hu6C1VHv3b (SEQ ID NO: 9). В изобретении дополнительно предложены две иллюстративные переменные области зрелой легкой цепи человека: Hu6C1VLv1 (SEQ ID NO: 16) и Hu6C1VLv2 (SEQ ID NOS: 17). Фиг. 1 и 2 иллюстрируют выравнивания переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи 6C1, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 6C1, соответственно.

[00169] По причинам, таким как: возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелыми и легкими цепями, взаимодействие с константной областью, является сайтом для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, является необычным остатком для своей позиции в последовательности переменной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию, и другим причинам, следующие десять позиций в каркасе переменной области были рассмотрены как

кандидаты на замещения в шести иллюстративных переменных областях зрелой легкой цепи человека, и в двух иллюстративных переменных областях зрелой тяжелой цепи человека, как указано далее в примерах: L2, L45, H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83, и H89.

[00170] Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, образованного путем вставки CDR по Кабату или составного CDR по Чотиа-Кабату в случае CDR-H1, в каркас акцептора человека, а второй упомянутый остаток представляет собой остаток, который рассматривается как заменяющий такой остаток. Таким образом, в пределах каркасов переменной области, первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR, первый упомянутый остаток является мышиным.

[00171] Иллюстративные антитела включают любые перестановки или комбинации иллюстративных переменных областей зрелых тяжелой и легкой цепей (например, Hu6C1VHv1/VLv1 или H1L1, Hu6C1VHv1b/VLv1 или H1bL1, Hu6C1VHv1/VLv2 или H1L2, Hu6C1VHv1b/VLv2 или H1bL2, Hu6C1VHv2/VLv1 или H2L1, Hu6C1VHv2b/VLv1 или H2bL1, Hu6C1VHv2/VLv2 или H2L2, Hu6C1VHv2b/VLv2 или H2bL2, Hu6C1VHv3/VLv1 или H3L1, Hu6C1VHv3b/VLv1 или H3bL1, Hu6C1VHv3/VLv2 или H3L2, и Hu6C1VHv3b/VLv2 или H3bL2).

[00172] В изобретении предложены варианты гуманизированных антител, в которых переменная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 4-9, а переменная область гуманизированной зрелой легкой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 16 или 17. В некоторых таких антителах сохраняют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или все 10 обратных мутаций, или других мутаций в SEQ ID NO: 4-9, 16 и 17.

[00173] В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83 и H89 в области V_H занята K, R, A, S, T, S, K и V соответственно. В некоторых антителах позиция H77 в области V_H занята T, как в Hu6C1VHv1. В некоторых антителах позиции H49 и H77 в области V_H заняты соответственно A и T, как в Hu6C1VHv1b. В некоторых антителах позиции H76, H77 и H82(a) в области V_H заняты S, T и S соответственно, как в Hu6C1VHv2. В некоторых антителах позиции H49, H76, H77 и H82(a) в области V_H заняты A, S, T и S соответственно, как в Hu6C1VHv2b. В

некоторых антителах позиции H19, H44, H77, H83 и H89 в области V_H заняты соответственно К, R, Т, К и М, как в Hu6C1VHv3. В некоторых антителах позиции H19, H44, H49, H77, H83 и H89 в области V_H заняты соответственно К, R, А, Т, К и М, как в Hu6C1VHv3b. В некоторых антителах позиция L45 в области V_L занята К. В некоторых антителах позиция L2 в области V_L занята I. В некоторых антителах одна или обе позиции L2 и L45 в области V_L заняты V и К соответственно, как в Hu6C1VLv1. В некоторых антителах одна или обе позиции L2 и L45 в области V_L заняты I и К соответственно, как в Hu6C1VLv2. Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или почти полностью идентичными областям CDR мышиного донорного антитела 6C1. Области CDR могут быть определены согласно любому общепринятому соглашению (например, по Чотиа, или составное по Чотиа и Кабату), но предпочтительно, как определено по Кабату.

[00174] Каркасные позиции переменных областей соответствуют нумерации Кабата, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных антител Hu6C1 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций. Такие отличия обычно приходятся на каркас, но могут также встречаться в CDR.

[00175] Возможность для дополнительных изменений в гуманизированных вариантах 6C1 - это дополнительные обратные мутации в каркасах переменной области. Многие из остатков каркаса, не контактирующих с CDR в гуманизированном mAb, могут вмещать замены аминокислот из соответствующих позиций донорного mAb мыши, или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные контактные остатки в CDR также поддаются замене. Даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, на остатки, обнаруженные в соответствующей позиции последовательности акцептора человека, используемой для предоставления каркасов переменной области. Кроме того, альтернативные последовательности акцептора человека могут быть использованы, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяются различные акцепторные последовательности, одна или несколько рекомендованных выше обратных мутаций могут не выполняться, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратных мутаций.

[00176] Предпочтительно замены или обратные мутации в вариантах Hu6C1 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного mAb, то есть его способность

связываться с мономерным TTR (например, активность в некоторых или всех анализах, описанных в настоящих примерах, варианта гуманизированного антитела 6C1 является по существу, такой же, то есть в пределах экспериментальной погрешности, как и у антитела 6C1 мыши).

D. Химерные и венированные антитела

[00177] В изобретении дополнительно предложены химерные и венированные формы нечеловеческих антител, в частности антител 6C1 примеров.

[00178] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легких и тяжелых цепей нечеловеческого антитела (например мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела почти полностью или полностью сохраняют специфичность связывания мышинового антитела, и составляют примерно две трети человеческой последовательности.

[00179] Венированное антитело является типом гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и, как правило, все CDR, и некоторые остатки каркаса нечеловеческой переменной области нечеловеческого антитела, но в котором заменяют другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например экспонированные остатки (Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489, 1991) на остатки из соответствующих позиций последовательности человеческого антитела. Результатом является антитело, в котором CDR взяты полностью или почти полностью из нечеловеческого антитела, и каркасы переменной области нечеловеческого антитела делают более подобными таковым человека с помощью замен. Венированные формы антитела 6C1 включены в изобретение.

E. Антитела человека

[00180] Человеческие антитела к мономерному TTR или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 89-97 (SEQ ID NO: 42) белка TTR) производят с помощью различных методов, описанных ниже. Некоторые антитела человека выбирают с помощью экспериментов по конкурентному связыванию, с помощью способа Винтера - фагового дисплея, описанного выше, или иным образом, что получить антитело с такой специфичностью к эпитопу, как и в конкретном антителе мыши, таком как одно из моноклональных антител мыши, описанные в примерах. Также для человеческих антител может быть проведен скрининг на специфичность к определенному эпитопу, используя

только фрагмент TTR, такой как вариант TTR, содержащий только аминокислотные остатки 89-97 TTR, в качестве целевого антигена, и/или скрининг антител против набора вариантов TTR, таких как варианты TTR, содержащие различные мутации в аминокислотных остатках 89-97 TTR.

[00181] Способы получения человеческих антител включают: способ триомы Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman *et al.*, патент США № 4634666, использование трансгенной мыши, содержащей гены иммуноглобулинов человека (см., например, Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) и способы фагового дисплея (*see, e.g.*, Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743; и US 5565332).

F. Выбор константной области

[00182] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей химерных, венированных или гуманизированных антител могут быть соединены, по меньшей мере, с частью константной области антитела человека. Выбор константной области зависит от желаемого эффекта будь-то антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или зависимость от комплемента цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека могут вызывать зависимость от комплемента цитотоксичность, а изотипы IgG2 и IgG4 человека - нет могут. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константными областями легкой цепи могут быть ламбда или каппа.

[00183] Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такая как С-концевой лизин тяжелой цепи, может отсутствовать, или может образовывать производное в пропорции, или быть во всех молекулах. Замены могут быть сделаны в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, Winter *et al.*, патент США № 5624821, Tso *et al.*, патент США № 5834597 и Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), или для увеличения периода полувыведения в человеке (*see, e.g.*, Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Типичные замены включают Gln в

позиции 250 и/или Leu в позиции 428 (нумерация ЕС используется в этом параграфе для константной области) для увеличения периода полувыведения антитела. Замены в любой или во всех позициях 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают сродство к рецепторам Fcγ, в частности рецептору FcγRI (см., например, US 6624821). Может быть использована аланиновая замена в позициях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела имеют замены на аланин в позициях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, аминокислоты в позициях 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека заменены на аланин, а в позиции 235 - на глутамин (см., например, US 5624821). В некоторых антителах используется мутация в одной или нескольких позициях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по нумерации ЕС IgG1 человека. В некоторых антителах используется мутация в одной или нескольких позициях 318, 320 и 322 по нумерации ЕС IgG1 человека. В некоторых антителах в позициях 234 и/или 235 аминокислота замещена аланином, и/или в позиции 329 замещена глицином. В некоторых антителах, в позициях 234 и 235 аминокислоты замещены на аланины, например, в SEQ ID NO: 27. В некоторых антителах, изотипом является IgG2 или IgG4 человека.

[00184] Иллюстративная константная область каппа-легкой цепи человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. N-концевой аргинин SEQ ID NO: 28 может быть опущен, и в этом случае константная область каппа-легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Иллюстративная константная область тяжелой цепи IgG1 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (с или без C-концевого лизина). Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

[00185] Константные области антитела человека показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидами, то есть константные области могут различаться у разных людей в одной или больше полиморфных позициях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или нескольких других изотипов. Так, например, другая константная область тяжелой цепи относится к аллотипу G1m3 IgG1 и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. Другая константная область тяжелой цепи аллотипа G1m3 IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 (с или без C-концевого лизина).

Отсылка к константной области антитела человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих позиции в природных аллотипах.

Г. Экспрессия рекомбинантных антител

[00186] Известен ряд способов продуцирования химерных и гуманизированных антител с использованием клеточной линии, экспрессирующей антитела (например, гибридомы). Например, иммуноглобулиновые переменные области антител могут быть клонированы и секвенированы с использованием хорошо известных способов. В одном способе, переменную область VH тяжелой цепи клонируют с помощью RT-PCR, с использованием мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры применяют к лидерному пептиду VH-области, охватывая кодон инициации трансляции посредством 5'-праймера, и константные области g2b посредством 3'-праймера. Иллюстративные праймеры описаны в публикации патента США 2005/0009150 Шенком и соавторами (далее «Шенк»). Последовательности из нескольких независимо полученных клонов можно сравнить для того, чтобы гарантировать, что во время амплификации не будут внесены изменения. Последовательность области VH также может быть определена или подтверждена путем секвенирования фрагмента VH, полученного с помощью 5'-RACE RT-PCR-методики и 3'-g2b-специфического праймера.

[00187] Аналогичным образом можно клонировать переменную область VL легкой цепи. В одном подходе, набор консенсусных праймеров предназначен для амплификации областей VL используя 5'-праймер, предназначенный для гибридизации с областью VL, включающей кодон инициации трансляции, и 3'-праймер, специфический к области Cκ ниже от V-J объединяющей области. Во втором подходе, используется 5'RACE RT-PCR методика для клонирования кодирующей кДНК VL. Иллюстративные праймеры описаны в Шенк, см. выше. Затем клонированные последовательности объединяют с последовательностями, кодирующими константные области человека (или других нечеловеческих видов). Иллюстративные последовательности, кодирующие константные области антитела человека, включают SEQ ID NO: 46, которая кодирует константную область IgG1 человека, и SEQ ID NO: 47 и 48, которые кодируют константную область каппа-легкой цепи человека.

[00188] В одном из подходов, переменные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для того, чтобы они кодировали соединённые донорные

последовательности после соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор для экспрессии в клетках млекопитающего, такой как pCMV-h γ 1 для тяжелой цепи, и pCMV-M κ 1 для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области γ 1 и C κ человека как экзонные фрагменты после вставленной кассеты с вариабельной областью. После проверки последовательности, векторы экспрессии с тяжелой цепью и легкой цепью могут быть совместно трансфицированы в клетки СНО для того, чтобы продуцировать химерные антитела. Среду, частично использованную клетками, собирают через 48 часов после трансфекции и анализируют Вестерн-блот-анализом на продуцирование антител, или ELISA на связывание антигена. Химерные антитела гуманизированы, как описано выше.

[00189] Химерные, венированные, гуманизированные и человеческие антитела обычно продуцируются с помощью рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природные или гетерологичные элементы контроля экспрессии, такие как промотор. Последовательности контроля экспрессии могут быть промоторными системами в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические или прокариотические клетки-хозяева. Как только вектор был внедрен в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, и сбора и очистки перекрёстно-реактивных антител.

[00190] Эти векторы экспрессии обычно реплицируются в организмах-хозяевах или в виде эписом, или как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат маркеры селекции, например резистентность к ампициллину или устойчивость к гигромицину для того, чтобы можно было обнаружить те клетки, что были трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[00191] *E. coli* представляет собой одного прокариотического хозяина, полезного для экспрессии антител, в частности фрагментов антител. Микробы, такие как дрожжи, также полезны для экспрессии. *Saccharomyces* представляет собой дрожжевого хозяина с подходящими векторами, имеющими последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации транскрипции, и тому подобное по желанию. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают, среди

прочего, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

[00192] Клетки млекопитающих могут быть использованы для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, Нью-Йорк, 1987). Был создан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают клеточные линии CHO, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие антитела клетки миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Клетки могут быть нечеловеческими. Экспрессирующие векторы для этих клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точку начала репликации, промотор, энхансер (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и терминирующие транскрипцию последовательности. Контролирующие экспрессию последовательности могут включать промоторы, полученные из: эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и тому подобных. Смотрите Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[00193] Альтернативно, последовательности, кодирующие антитела, могут быть внесены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, патент США № 5741957; США № 5304489; и США № 5849992). Подходящие трансгены содержат кодирующие последовательности легких и/или тяжелых цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из специфического гена молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

[00194] Векторы, содержащие интересующие сегменты ДНК, могут быть перенесены в клетку-хозяина способами, зависящими от типа клеточного хозяина. Например, трансфекция с помощью хлорида кальция обычно используется для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция, электропорация, липофекция, биолистика или трансфекция на основе вирусов могут применяться к другим клеточным хозяевам. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают использование полибрена, слияние протопластов, липосомы, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных, трансгены могут быть микроинъекцированы в оплодотворенные ооциты или могут быть внесены в геном

эмбриональных стволовых клеток, а ядра таких клеток перенесены в избавленные от ядра ооциты.

[00195] После введения вектора(-ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела, в культуру клеток, клеточные пулы можно проскринировать на рост продуктивности и качество продукта в бессывороточной среде. Топ-продуцирующие пулы клеток затем могут быть подвергнуты поклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Могут использоваться специфические урожайности выше 50 пг или 100 пг на клетку в день, которые соответствуют титрам продукта более 7,5 г на л культуры. Антитела, продуцирование клонами одной клетки, также могут быть протестированы на мутность, фильтрационные свойства, проведены PAGE, IEF, УФ сканирование, HP-SEC, картирование углеводов-олигосахаридов, масс-спектрометрия и анализ связывания, такой как ELISA или Biacore. Выбранный клон затем может быть перенесен в несколько флаконов и сохранен в замороженном виде для последующего использования.

[00196] После экспрессии, антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в данной области техники, включая захват белком А, очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и тому подобное (см., в целом, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, Нью-Йорк, 1982)).

[00197] Может быть использована методика коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, подбор промоторов, выбор элементов транскрипции, выбор терминаторов, клонирование из одной клетки без сыворотки, создание стока клеток, использование маркеров отбора для амплификации количества копий, терминатора СНО, или улучшение титров белка (см., например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, W02004/050884, W02008/012142, W02008/012142, W02005/019442, W02008/107388, W02009/027471 и US 5888809).

Н. Скрининговые исследования антитела

[00198] Антитела могут подвергаться нескольким исследованиям, включая исследования связывания, исследования функциональности, исследования на животных моделях заболеваний, связанных с отложениями TTR, и клинические испытания. Исследования связывания тестируют специфическое связывание и, необязательно, аффинность и специфичность к эпитопу, с мономерным TTR или его фрагментом. Например, в анализах связывания могут подвергать скринингу антитела, которые

связываются с аминокислотными остатками 89-97 (SEQ ID NO: 42) TTR, которые являются эпитопом, что погружен в нативном тетрамере TTR, и является экспонированным в мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формах TTR. Антитела также могут быть подвергнуты скринингу на способность связывать пре-фибриллярные, ненативные конформации TTR и амилоидные фибриллы TTR, но не нативные конформации TTR. Например, антитела могут быть подвергнуты скринингу на способность связываться с мономерными формами TTR, созданными путем диссоциации или дезагрегации нативного тетрамерного TTR, и могут быть в тоже время подвергнуты скринингу против нативного тетрамерного TTR, как описано в примерах, или иным образом. Аналогично, антитела также могут быть подвергнуты скринингу на их иммунореактивность на ткань, подверженную TTR-опосредованному амилоидозу, но не на здоровую ткань. Такие исследования иногда проводят вместе с конкурентным иллюстративным антителом, таким как антитело, имеющее переменные области 6C1 или каппа-изотипа IgG1. Необязательно, в таком анализе иммобилизуют или антитело, или TTR-мишень.

[00199] Исследования функциональности могут быть выполнены в клеточных моделях, включая клетки, естественно экспрессирующие TTR, или клетки трансфицированные ДНК, кодирующим TTR или его фрагментом. Подходящие клетки включают клетки, полученные из сердечной ткани или других тканей, пораженных TTR-амилоидогенезом. Клетки могут быть подвергнуты скринингу на пониженные уровни мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR (например, путем Вестерн-блоттинга, или путем иммунопреципитации клеточных экстрактов или супернатантов) или на сниженную токсичность, приписываемую мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам TTR. Например, антитела могут быть протестированы на способность ингибировать или уменьшать агрегацию TTR, ингибировать или уменьшать образование фибрилл TTR, уменьшать отложение TTR, удалять агрегированный TTR или стабилизировать нетоксичные конформации TTR.

[00200] Могут быть выполнены в растворе другие функциональные анализы, такие как проверка того, способно ли антитело нарушать или уменьшать образование фибрилл TTR, когда мономерный TTR или промежуточные формы неправильно свернутого TTR в растворе контактируют с антителом. Степень образования фибрилл может быть исследована измерениями мутности, например, при 400 нм на УФ-детектирующем спектрометре, оснащенном блоком управления температурой. Также может быть

использован тиофлавин-Т для оценки степени формирования амилоидных фибрилл. Например, пятикратный молярный избыток тиофлавина-Т можно добавить к образцам TTR и оставить их при комнатной температуре на 30 минут перед проведением измерений. Флюоресценцию тиофлавина-Т можно наблюдать с помощью спектрофлуориметра. Смотрите US 2014/0056904.

[00201] Исследования с применением животных моделей тестируют способность антитела к терапевтическому или профилактическому лечению признаков или симптомов на животной модели, моделирующей болезнь человека, связанную с накоплением TTR или отложениями TTR. К таким заболеваниям относятся типы амилоидоза TTR, такие как старческий системный амилоидоз (SSA - senile systemic amyloidosis), старческий сердечный амилоидоз (SCA - senile cardiac amyloidosis), семейная амилоидная полинейропатия (FAP - familial amyloid polyneuropathy), семейная амилоидная кардиомиопатия (FAC - familial amyloid cardiomyopathy) и селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA - central nervous system selective amyloidosis). Подходящими признаками или симптомами, которые можно наблюдать, являются присутствие и количество амилоидных отложений в различных тканях, таких как желудочно-кишечный тракт или сердце. Степень снижения количества амилоидных отложений можно определить сравнением с соответствующим контролем, таким как уровень отложений амилоидов TTR у контрольных животных, которые получили контрольное антитело (например, контрольное антитело с подобранным изотипом), плацебо или вовсе не получали лечения. Иллюстративная животная модель для тестирования активности против амилоидоза TTR представляет собой мышиную модель, несущую нуль-мутацию в эндогенном локусе *Ttr* мыши и человеческий мутантный ген TTR, содержащий мутацию V30M, которая связана с семейной амилоидной полинейропатией. Смотрите, например, Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso and Saraiva, *FASEB J* 20(2):234-239 (2006). Также существуют подобные модели, включающие другие модели семейных вариантов амилоидоза TTR и модели для спорадических вариантов амилоидоза TTR. См., например, Teng *et al.*, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito and Maeda, *Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis, in Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions*, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Трансгенные животные могут содержать человеческий трансген TTR, такой как трансген TTR с мутацией, ассоциированной с амилоидозом TTR, или трансген TTR дикого типа. Чтобы облегчить тестирование на животных моделях, можно использовать химерные антитела, имеющие константную область, подходящую

для животной модели (например, химерные антитела мыша-крыса можно использовать для тестирования антител на крысах). Можно сделать вывод, что гуманизированная версия антитела будет эффективной, если соответствующее антитело мыши или химерное антитело будет эффективным в соответствующей животной модели, и гуманизированное антитело имеет сходную аффинность связывания (например, в пределах экспериментальной ошибки, например, при коэффициенте 1,5, 2 или 3).

[00202] Клинические испытания исследуют безопасность и эффективность для человека, имеющего заболевание, связанное с амилоидозом TTR.

I. Нуклеиновые кислоты

[00203] В изобретении дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелых и легких цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 4-9, 16 и 17). Необязательно, такие нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют сигнальный пептид и могут быть экспрессированы с сигнальным пептидом, соединенным с константной областью (например, сигнальные пептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49 (тяжелая цепь) и 51 (легкая цепь), которые могут кодироваться соответственно SEQ ID NO: 50 (тяжелая цепь) и соответственно 52 (легкая цепь)). Кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, такими как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть в выделенной форме или могут быть клонированы в один или несколько векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, путем твердофазного синтеза или ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной сплошной нуклеиновой кислоты, например, внутри вектора экспрессии или могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела

[00204] Конъюгированные антитела, специфически связывающиеся с антигенами, экспонированными в патогенных формах TTR, но не в нативных тетрамерных формах TTR, такими как аминокислотные остатки 89-97 (SEQ ID NO: 42) TTR, полезны для: обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или

фибрильной форм TTR; наблюдения и оценки эффективности терапевтических средств, используемых для лечения пациентов с диагнозом TTR-амилоидоз; ингибирования или снижения агрегации TTR; ингибирования или уменьшения образования фибрилл TTR; уменьшения количества или удаления отложений TTR; стабилизации нетоксичных конформаций TTR; или лечения или осуществления профилактики TTR-амилоидоза у пациента. Например, такие антитела могут быть конъюгированы с другими терапевтическими фрагментами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками. Смотрите WO 03/057838; US 8455622.

[00205] Конъюгированными терапевтическими фрагментами могут быть любые вещества, которые могут быть использованы для лечения, борьбы, улучшения, предотвращения или улучшения нежелательного состояния или течения заболевания у пациента, например, амилоидоза TTR. Терапевтические вещества могут включать, например, иммуномодуляторы или любые биологически активные вещества, которые стимулируют или усиливают активность антитела. Иммуномодулятором может быть любое вещество, которое стимулирует или ингибирует, развитие или поддержание иммунологического ответа. Если такие терапевтические фрагменты связаны с антителом, специфичным к мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам TTR, таким как описанные в данном документе антитела, то присоединённые терапевтические фрагменты будут иметь специфическую аффинность к чужеродным патогенным формам TTR по сравнению с нативными тетрамерными формами TTR. Следовательно, введение конъюгированных антител непосредственно воздействует на ткани, содержащие патогенные формы TTR, с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Это может быть особенно полезно для терапевтических компонентов, которые слишком токсичны для введения самих по себе. Кроме того, можно использовать меньшее количество терапевтических веществ.

[00206] Примеры подходящих терапевтических вещества включают лекарственные средства, которые снижают уровни TTR, стабилизируют нативную тетрамерную структуру TTR, ингибируют агрегацию TTR, разрушают фибриллы TTR или мешают образованию амилоида, или противодействуют токсичности для клетки. Смотрите, например, Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013); Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); и Johnson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 421(2-3):185-203 (2012). Например, антитела могут быть конъюгированы с тафамидом, дифлуниазом, ALN-TTR01, ALNTTR02, ISIS-TTRRx, доксициклином (doxy), таурорсодезоксихолевой

кислотой (TUDCA), Doxy-TUDCA, галлатом эпигаллокатехина (EGCG), куркумином или ресвератролом (3,5,4'-тригидроксистильбенем). Другие репрезентативные терапевтические фрагменты включают другие вещества, которые, как известно, полезны для лечения, контроля или улучшения амилоидоза TTR или симптомов амилоидоза TTR. См., например, Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013) для общеизвестных клинических симптомов амилоидоза TTR и типичных веществ, используемых для лечения таких симптомов.

[00207] Антитела также могут быть соединены с другими белками. Например, антитела могут быть соединены с файномерами (Fynomers). Файномеры представляют собой небольшие связывающие белки (например, 7 кДа), полученные из человеческого домена Fyn SH3. Они могут быть стабильными и растворимыми, и они могут быть лишены цистеиновых остатков и дисульфидных связей. Файномеры могут быть сконструированы для связывания с молекулами-мишенями с той же аффинностью и специфичностью, что и антитела. Они подходят для создания мультиспецифических гибридных белков на основе антител. Например, файномеры могут быть слиты с N-концевыми и/или C-концевыми концами антител для создания би- и триспецифических файномерных антител (FynomAb) с различными структурами. Файномеры могут быть подобраны с использованием библиотек файномеров, с помощью технологии скрининга с применением FACS, Biacore и клеточных анализов, которые позволяют эффективно выбирать файномеры с оптимальными свойствами. Примеры файномеров описаны в Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter *et al.*, *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner *et al.*, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); и Brack *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

[00208] Указанные в данном документе антитела также могут быть связаны или конъюгированы с одним или несколькими другими антителами (например, для образования гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с различными эпитопами в пределах TTR или его части, или могут связываться с другим целевым антигеном.

[00209] Антитела также могут быть соединены с детектируемой меткой. Такие антитела могут быть использованы, например, для диагностики амилоидоза TTR, для мониторинга прогрессирования амилоидоза TTR и/или для оценки эффективности лечения. Такие антитела особенно полезны для выполнения таких определений у субъектов, которые подвержены или могут быть подвержены TTR-амилоидозу, или в

соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные обнаруживаемые метки, которые могут быть присоединены или прицеплены к гуманизированному антителу 6C1, включают: различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; протезные группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как зонтиллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и аэкорин; радиоактивные материалы, такие как иттрий⁹⁰ (90Y), радиосеребро-111, радиосеребро-199, висмут²¹³, йод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, и ¹¹⁷Tm; позитрон-излучающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые радиоактивно мечены или конъюгированы с определенными радиоизотопами.

[00210] Связывание радиоизотопов с антителами может быть выполнено с использованием обычных бифункциональных хелатов. Для присоединения радиосеребра-111 и радиосеребра-199 можно использовать линкеры на основе серы. Смотрите Hazra *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Присоединение радиоизотопов серебра может включать восстановление иммуноглобулина с помощью аскорбиновой кислоты. Для радиоизотопов, таких как 111In и 90Y, можно использовать иритримомаб-тиуксетан, и оно будет реагировать с такими изотопами с образованием 111In-иритримомаб-тиуксетана и 90Y-иритримомаб-тиуксетана, соответственно. Смотрите Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[00211] Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы, прямо или косвенно через посредник (например, линкер), с мышинным, химерным, венированным или гуманизированным антителом 6C1, применяя методы, известные в данной области техники. Смотрите, например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc.

1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические фрагменты, белки, антитела и/или детектируемые метки в кислотных или восстановительных условиях, при воздействии специфических протеаз или в других определенных условиях.

V. Терапевтические применения

[00212] Вышеуказанные антитела могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболевания у пациента, имеющего или подверженного риску заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, транстиретином (TTR) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами TTR. Хотя понимание механизмов не требуется для практики, считается, что любой или все из следующих механизмов могут способствовать лечению амилоидоза TTR с использованием вышеуказанных антител: опосредованное антителом ингибирование агрегации и образования фибрилл TTR, опосредованная антителом стабилизация нетоксичных конформаций TTR (например, тетрамерных форм), или опосредованный антителом клиренс агрегированного TTR, олигомерного TTR или мономерного TTR. Антитело-лекарственные конъюгаты могут иметь дополнительные механизмы действия, обусловленные конъюгированным фрагментом.

[00213] Антитела вводят эффективной схемой, что обозначает дозировку, способ введения и частоту введения, которая задерживает начало проявления симптомов, уменьшает тяжесть заболевания, замедляет дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один признак или симптом расстройства, что подвергается лечению. Если пациент уже страдает от расстройства, схему можно обозначить как терапевтически эффективная схема. Если пациент подвергается повышенному риску заболевания по сравнению с общей популяцией, но еще не испытывает симптомов, схему можно назвать профилактически эффективной схемой. В некоторых случаях можно наблюдать терапевтическую или профилактическую эффективность у отдельного пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом у того же пациента. В

других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом исследовании на популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией необработанных пациентов.

[00214] Частота введения зависит от периода полувыведения антитела из кровообращения, состояния пациента и пути введения среди прочих факторов. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирования расстройства, которое лечится. Иллюстративная частота внутривенного введения находится между еженедельной и ежеквартальной при непрерывном курсе лечения, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Для подкожного введения иллюстративная частота дозирования составляет от ежедневной до ежемесячной, хотя возможно более или менее частое дозирование.

[00215] Количество вводимых доз зависит от того, является ли заболевание острым или хроническим, а также ответа расстройства на лечение. При острых расстройствах или острых обострениях хронического расстройства часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одной болюсной дозы, необязательно в виде разделенной дозы, достаточно для острого расстройства или острого обострения хронического расстройства. Лечение может повторяться для рецидивов острого расстройства или острого обострения. При хронических заболеваниях антитело можно вводить через регулярные промежутки времени, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет, или в течение жизни пациента.

VI. Фармацевтические композиции и способы их применения

[00216] В данном документе приведены несколько способов диагностики, мониторинга, лечения или осуществления профилактики заболеваний или состояний, опосредованных, по меньшей мере частично, транстиретином (TTR) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами TTR (например, амилоидоз TTR). Примеры таких заболеваний включают семейные амилоидозы TTR, такие как семейная амилоидная кардиомиопатия (FAC), семейная амилоидная полинейропатия (FAP), или селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA), и спорадические амилоидозы TTR, такие как старческий системный амилоидоз (SSA) или старческий сердечный амилоидоз (SCA). Антитела, описанные выше, могут

быть включены в фармацевтическую композицию для использования в таких способах. В целом, как правило, антитело или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидов с риском амилоидоза TTR, но не проявляющих симптомов, а также пациентов, которые в настоящее время проявляют симптомы. Некоторых пациентов можно лечить во время продромальной стадии амилоидоза TTR.

[00217] Фармацевтические композиции можно вводить профилактически лицам, имеющим известный генетический риск амилоидоза TTR. К таким лицам относятся те, у кого есть родственники, которые подверглись такому заболеванию, и те, чей риск определяется анализом генетических или биохимических маркеров (например, мутаций в TTR, связанных с амилоидозом TTR), включая использование диагностических методов, представленных в данном документе. Например, в гене, кодирующем TTR, более 100 мутаций, которые вовлечены в TTR амилоидоз. См., например, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet and Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983).

[00218] Индивиды, страдающие от TTR амилоидоза могут иногда быть распознаны по клиническим проявлениям TTR амилоидоза, включая одно или несколько из следующих: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) невропатическая боль или прогрессирующие сенсорные нарушения неизвестной этиологии; 3) синдром кистевого туннеля без очевидной причины, особенно если он двусторонний и требует хирургического устранения; 4) нарушения моторики желудочно-кишечного тракта или дисфункция автономной нервной системы неизвестной этиологии (например, эректильная дисфункция, ортостатическая гипотензия, нейрогенный голод); 5) сердечная болезнь, характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атрио-вентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Окончательный диагноз TTR амилоидоза обычно опирается на биопсию органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя Congo red. Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание для TTR, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является TTR. Для семейных форм заболеваний,

необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем TTR, до постановки окончательного диагноза.

[00219] Идентификация субъекта может происходить в клинической обстановке или в другом месте, таком как дом субъекта, например, посредством использования субъектом собственного набора для самопроверки. Например, субъект может быть идентифицирован на основе различных симптомов, таких как периферическая невропатия (сенсорная и моторная), вегетативная нейропатия, желудочно-кишечные нарушения, кардиомиопатия, нефропатия или отложения в глазах. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Субъект также может быть идентифицирован по повышенным уровням ненативных форм TTR в образцах плазмы, полученных от субъекта, по сравнению с контрольными образцами, как описано в примерах.

[00220] В соответствии с семейной историей, генетическим тестированием или медицинским скринингом на амилоидоз TTR, лечение может быть начато в любом возрасте (например, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 лет). Лечение обычно влечет за собой многократное дозирование в течение определенного периода времени и может контролироваться путем анализа антител или активированных ответов Т-клеток или В-клеток на терапевтическое вещество (например, усеченную форму TTR, содержащую аминокислотные остатки 89-97) со временем. Если ответ спадает, требуется усиливающая его доза.

[00221] В профилактических применениях антитело или его фармацевтическую композицию вводят субъекту, восприимчивому к заболеванию или подверженному риску заболевания (например, TTR амилоидозу), схемой (доза, частота и способ введения), эффективной для того, чтобы уменьшить риск, снизить тяжесть или задержать начало проявления по крайней мере одного признака или симптома заболевания. В терапевтических применениях антитело, или иммуноген для индукции антитела, вводят субъекту, который подозревается в наличии болезни или уже страдает от болезни (например, TTR амилоидоза), схемой (доза, частота и способ введения), эффективной чтобы улучшить или, по меньшей мере, воспрепятствовать дальнейшему ухудшению, по меньшей мере, одного признака или симптома заболевания.

[00222] Схема считается терапевтически или профилактически эффективной, если отдельный субъект, прошедший лечение, достигает более благоприятного исхода, чем средний исход в контрольной популяции сопоставимых субъектов, не прошедших лечение

описанными в данном документе способами, или если демонстрируется более благоприятный исход для схемы у прошедших лечение субъектов по сравнению с контрольными субъектами в контролируемом клиническом исследовании (например, фаза II, фаза II/III или фазы III исследования), или у животной модели на уровне $p < 0,05$ или 0,01 или даже 0,001.

[00223] Эффективная схема лечения антителом может быть использована, например, для: ингибирования или уменьшения агрегации TTR у субъекта, имеющего или находящегося под риском приобрести состояние, связанное с накоплением TTR; ингибирования или уменьшения образования фибрилл TTR у субъекта, имеющего или находящегося под риском приобрести состояние, связанное с накоплением TTR; уменьшения количества или удаления отложений TTR, или агрегированного TTR у субъекта, имеющего или находящегося под риском приобрести состояние, связанное с накоплением TTR; стабилизации нетоксичных конформаций TTR у субъекта, имеющего или находящегося под риском приобрести состояние, связанное с накоплением TTR; ингибирования токсических эффектов агрегатов, фибрилл или отложений TTR у субъекта, имеющего или находящегося под риском приобрести состояние, связанное с накоплением TTR; диагностирования наличия или отсутствия накопления TTR амилоидов в ткани, предположительно содержащей накопление амилоида; определения количества отложений TTR у субъекта путем обнаружения наличия связанного антитела у субъекта после введения антитела; обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR у субъекта; мониторинга и оценки эффективности терапевтических средств, используемых для лечения пациентов с диагнозом TTR амилоидоз; индуцирования иммунного ответа, включающего антитела к TTR у субъекта; задержки начала состояния, связанного с накоплением TTR амилоида у субъекта; или лечения, или осуществления профилактики TTR амилоидоза у пациента.

[00224] Эффективные дозы варьируют в зависимости от многих различных факторов, таких как способ введения, целевая локализация, физиологическое состояние субъекта, независимо от того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

[00225] Иллюстративный диапазон доз для антител может составлять около 0,1-20, или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/кг) или 10-1500 мг в виде фиксированной дозы. Дозирование зависит от состояния пациента и реакции на предшествующий курс лечения, если таковой имеется, является ли лечение

профилактическим или терапевтическим и является ли заболевание острым или хроническим, среди прочих факторов.

[00226] Антитело можно вводить в таких дозах ежедневно, в чередующиеся дни, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или в соответствии с любым другим графиком, определяемым эмпирическим анализом. Иллюстративное лечение влечет за собой введение несколькими дозами в течение длительного периода, например, по меньшей мере, в течение шести месяцев. Дополнительные иллюстративные схемы лечения сопряжены с введением один раз в две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев.

[00227] Антитела могут вводиться через периферический путь. Пути введения включают местный, внутривенный, оральный, подкожный, внутриартериальный, внутрочерепный, интратекальный, внутрибрюшинный, интраназальный или внутримышечный. Пути для введения антител могут быть внутривенными или подкожными. Внутривенное введение может быть реализовано, например, путем инфузии в течение периода, такого как 30-90 мин. Этот тип инъекций чаще всего выполняется в мышцы рук или ног. В некоторых способах вещества вводят непосредственно в определенную ткань, где накапливаются отложения, например путем внутрочерепной инъекции.

[00228] Фармацевтические композиции для парентерального введения могут быть стерильными и, по существу, изотоническими (250-350 мОсм/кг воды) и изготавливаться в условиях ХПП (хорошей практики производства, GMP - good manufacturing practice). Фармацевтические композиции могут быть представлены в виде единичной дозированной формы (то есть дозе для одного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций, антитела могут быть приготовлены в виде водных растворов, например, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера, или физиологическом солевом растворе, или ацетатном буфере (чтобы уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. Альтернативно, антитела могут быть в лиофилизированной форме для разбавления перед использованием подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой.

[00229] Схемы введения могут быть скомбинированы со схемами приема других средств, эффективных при лечении или профилактике заболевания, подлежащего лечению. Такие вещества могут включать siRNA для ингибирования экспрессии TTR, или Vyndaqel, стабилизатора TTR в тетрамерной форме.

[00230] После лечения, состояние субъекта может быть оценено для определения прогресса или эффективности такого лечения. Такие способы предпочтительно проверяют изменение количества TTR амилоида или количества ненативных форм TTR. Например, количества амилоида TTR могут быть оценены для определения улучшения по сравнению с количествами амилоида TTR у субъекта при сравнимых обстоятельствах до лечения. Количества TTR амилоида субъекта также могут сравниваться с контрольными популяциями в сопоставимых условиях. Контрольные популяции могут состоять из одинаково пораженных, не подвергавшихся лечению субъектов или обычных, не подвергавшихся лечению субъектов (среди других контрольных субъектов). Улучшение по сравнению с одинаково пораженными, не подвергавшимся лечению субъектами, или количествами, достигающими или приближающимися к таковым обычных, не подвергавшихся лечению субъектов, указывает на положительный ответ на лечение.

[00231] Количества амилоида TTR могут быть измерены с помощью ряда способов, включая методы визуализации. Примеры подходящих методов визуализации включают ПЭТ-сканирование с помощью радиоактивно меченого TTR или его фрагментов, антител к TTR или их фрагментов, визуализирующих амилоид основанных на красителе Congo-red веществах, таких как, например, PIB (US 2011/0008255), амилоид-визуализирующий пептид p31 (биораспределение амилоид-визуализирующего пептида p31, коррелирует с количественной оценкой амилоида на основе окрашивания ткани Congo-red, Wall *et al.*, Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting) и других меток ПЭТ. Уровни ненативных форм TTR могут быть измерены, например, путем анализа ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинг или плашковым анализом Meso Scale Discovery с антителами, описанными в данном документе, на образцах плазмы или образцах биопсии из субъекта, при сравнении с контрольными образцами, как описано в примерах.

A. Способы диагностики и мониторинга

[00232] Также предложены способы обнаружения иммунного ответа против TTR у пациента, страдающего или подверженного заболеваниям, связанным с отложениями TTR или патогенными формами TTR (например, мономерными, неправильно свернутыми,

агрегированными или фибрильными формами TTR). Способы могут использоваться для контроля курса терапевтического и профилактического лечения с помощью предлагаемых здесь веществ. Профиль антител после пассивной иммунизации обычно показывает непосредственный пик концентрации антител с последующим экспоненциальным разрушением. Без дополнительной дозы распад приближается к предшествующим лечению уровням в период от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от периода полувыведения вводимого антитела. Например, период полувыведения некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

[00233] В некоторых способах перед введением проводят измерение исходного уровня антитела к TTR у субъекта, вскоре после этого проводится второе измерение для определения пикового уровня антитела, и проводят одно или несколько дополнительных измерений с интервалами, для мониторинга уменьшения количества антител. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или заданного процента от пика меньше базового уровня (например, 50%, 25% или 10%), приписывают введение дополнительной дозы антитела. В некоторых способах, пиковые уровни или измеренные после них уровни меньше базового, сравнивают с эталонными уровнями, определенными до этого, чтобы составить целесообразную профилактическую или терапевтическую схему лечения для других пациентов. Если измеренный уровень антител значительно меньше эталонного уровня (например, меньше среднего минус одно или, предпочтительно, два стандартных отклонения эталонного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), приписывают введение дополнительной дозы антитела.

[00234] Также предложены способы обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной, или фибрильной форм TTR у субъекта, например, путем измерения TTR амилоида или патогенных форм TTR (например, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR) в образце от субъекта или путем *in vivo*-визуализации TTR у субъекта. Такие способы полезны для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с такими патогенными формами TTR (например, TTR амилоидоза) или восприимчивостью к ним. Также могут быть использованы способы для бессимптомных субъектов. Наличие мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм TTR указывает на восприимчивость к будущему симптоматическому заболеванию. Эти способы также полезны для наблюдения за прогрессированием заболевания и/или ответом на лечение у пациентов, которым ранее был диагностирован TTR амилоидоз.

[00235] Биологические образцы, полученные от субъекта, подозреваемого в наличии или находящимся под риском наличия TTR-амилоидоза, могут быть приведенными в контакт с антителами, раскрытыми в данном документе, для оценки присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR. Например, уровни мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR у таких субъектов можно сравнить с уровнями, характерными для здоровых людей. Альтернативно, уровни TTR амилоида или патогенных форм TTR (например, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR) у таких субъектов, получающих лечение по заболеванию, можно сравнить с таковыми пациентов, которые не лечились от TTR амилоидоза. Некоторые такие тесты включают биопсию ткани, полученную от таких субъектов. Анализы ELISA также могут быть полезными способами, например, для оценки уровней мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR в образцах жидкости. Некоторые такие анализы ELISA включают применение антител против TTR, предпочтительно связывающих мономерную, неправильно свернутую, агрегированную или фибрильную формы TTR относительно нормальных тетрамерных форм TTR.

[00236] Способы визуализации *in vivo* могут работать путем введения реагента, такого как антитело, которое связывается с мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами TTR в субъекте, а затем обнаружения реагента после того, как он связался. Такие антитела обычно связываются с эпитопом в пределах остатков 89-97 TTR. При желании, реакции устранения можно избежать с использованием фрагментов антител, не имеющих полноразмерной константной области, таких как Fabs. В некоторых способах, одно и то же антитело может служить как лечебным, так и диагностическим реагентом.

[00237] Диагностические реагенты могут быть введены в организм субъекта путем внутривенной инъекцией, или другими путями, которые считаются разумными. Доза реагента должна быть в тех же пределах, что и для способов лечения. Как правило, реагент метят, хотя в некоторых способах первичный реагент с аффинностью к мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам TTR является немеченым, а вторичный меченный реагент используется для связывания с первичным реагентом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Использование парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического

вмешательства. Радиоактивные метки также могут быть обнаружены с использованием ПЭТ или ОФЭКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии).

[00238] Диагностика выполняется путем сравнения количества, размера и/или интенсивности помеченных локусов с соответствующими значениями базовой линии. Значения базовой линии могут представлять собой средние уровни в популяции неподверженных заболеванию индивидов. Значения базовой линии также могут представлять предыдущие уровни, определенные в одном и том же субъекте. Например, значения базовой линии могут быть определены у субъекта до начала лечения, а затем измеренные значения сравнивают с значениями базовой линии. Снижение значений относительно базовой линии обычно сигнализирует о положительном ответе на лечение.

IX. Наборы

[00239] В изобретении дополнительно предложены наборы (например, контейнеры), содержащие гуманизированные антитела 6C1, раскрытые в данном документе, и связанные с ним материалы, такие как инструкции для использования (например, вкладыш в упаковке). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции для введения антител, и, необязательно, одно или несколько дополнительных веществ. Контейнеры с антителами могут быть в форме одиночных доз, многоразовых упаковок (например, упаковок с несколькими дозами) или суб-единичных доз.

[00240] Вкладыш упаковки относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, использовании, дозировке, назначении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

[00241] Наборы могут также содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI - bacteriostatic water for injection), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он также может содержать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

X. Другие применения

[00242] Антитела могут быть использованы для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм транстиретина (TTR) или

их фрагментов, в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Например, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR в биологическом образце в качестве индикатора того, что биологический образец содержит отложения TTR амилоида. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить с связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки того же самого тканевого происхождения. Контрольные образцы и биологические образцы могут быть получены от тех же или разных лиц, и в том же отборе проб или в разных отборах проб. При желании множество биологических образцов и множество контрольных образцов оценивают при многочисленных отборах проб, чтобы избежать случайного отклонения, независимого от различий между образцами. Затем может быть проведено прямое сравнение между биологическим образцом(-ами) и контрольным образцом (-ами), чтобы определить, увеличивается ли, уменьшается ли, или остается таким же связывание антитела (т. е. присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR) с биологическим образцом(-ами) относительно связывания антитела с контрольным образцом(-ами). Повышенное связывания антитела с биологическим образцом(-ами) по сравнению с контрольным образцом(-ами) указывает на присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR в биологическом образце(-ах). В некоторых случаях повышенное связывания антитела является статистически значимым.

Необязательно, связывание антитела с биологическим образцом является по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз или в 100 раз более сильным, чем связывание антитела с контрольным образцом.

[00243] Кроме того, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR в биологическом образце для наблюдения и оценки эффективности лекарственного средства, что применяется для лечения пациента с диагностированным TTR амилоидозом. Оценивают биологический образец из пациента с диагнозом TTR амилоидоз, чтобы установить исходный уровень связывания антител с образцом (т. е. исходный уровень наличия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR в образце) перед началом терапии лекарственным препаратом. В некоторых случаях, множество биологических образцов из пациента оцениваются при множестве отборов проб, чтобы установить как исходное значение, так и меру случайного отклонения, не зависящего от лечения. Затем лекарственный препарат вводят в схему приема лекарства.

Схема может включать множество введений вещества в течение определенного периода времени. Необязательно, связывание антител (т. е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR) оценивается при множественном отборе проб по множеству биологических образцов из пациента, как для определения меры случайного отклонения, так и для демонстрации тенденции в ответ на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с биологическими образцами. Если будут сделаны только два оценивания, можно провести прямое сравнение между двумя оцениваниями, чтобы определить, увеличилось ли, уменьшилось ли или оставалось неизменным связывание антитела между двумя оцениваниями (т.е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR). Если проведено более двух измерений, измерения могут быть проанализированы как временной курс, начинающийся до лечения лекарственным препаратом, и длящийся все время терапии. Для пациентов, у которых уменьшилось связывание антител с биологическими образцами (т. е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR), можно сделать вывод, что лекарственный препарат был эффективным при лечении амилоидоза TTR у пациента. Снижение связывания антител может быть статистически значимым. Необязательно, связывание уменьшается по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 % или 100%. Оценка связывания антитела может быть проведена в сочетании с оценкой других признаков и симптомов TTR амилоидоза.

[00244] Антитела также могут быть использованы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований, для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR или их фрагментов. В таких применениях антитела могут быть помечены флуоресцентными молекулами, спин-мечеными молекулами, ферментами или радиоизотопами, и могут быть предоставлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения детектирующего анализа. Антитела также могут быть использованы для очистки мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR, или партнеров по связыванию мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR, например, с помощью аффинной хроматографии.

[00245] Антитела также могут быть использованы для ингибирования или уменьшения агрегации TTR, ингибирования или уменьшения формирования фибрилл TTR, уменьшения или устранения отложений TTR или агрегатов TTR, или стабилизации нетоксичных конформаций TTR в биологическом образце. Биологический образец может

содержать, например, кровь, сыворотку, плазму или ткань (например, ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почки, глаза или желудочно-кишечного тракта). В некоторых случаях агрегация TTR, образование фибрилл TTR, или отложения TTR ограничиваются или снижаются, по меньшей мере, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% или 75% (например, 10%-75 % или 30% -70%). Анализы для обнаружения образования фибрилл описаны в другом месте в данном документе. См. также US 2014/0056904.

[00246] Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, идентификационные номера и тому подобное, упомянутые выше или ниже, включены посредством ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный элемент был специально и индивидуально указан, чтобы быть включенным посредством ссылки. Если в разное время с идентификационным номером ассоциированы разные варианты последовательности, то под этим идентификационным номером подразумевается вариант, ассоциированный с ним на момент действительной даты подачи настоящей заявки. Действительная дата подачи означат наиболее раннюю действительную дату подачи или дату подачи приоритетной заявки со ссылкой на идентификационный номер при необходимости. Подобным образом, если разные варианты публикации, веб-сайта и тому подобного опубликованы в разное время, подразумевается вариант, опубликованный раньше всего на действительную дату подачи, если не указано иное. Любое свойство, этап, элемент, вариант осуществления изобретения, или аспект изобретения могут использоваться в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Хотя настоящее изобретение было описано более подробно с помощью иллюстрации и примера для ясности и понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Идентификация моноклональных антител к mis-TTR

[00247] Конформационно-специфичные моноклональные антитела против мономерной, неправильно свернутой, фибриллярной или агрегированной форм TTR (mis-TTR) создавали, подвергали скринингу, экспрессировали и очищали, как описано в «Материалы и способы» (a-d). Для создания моноклональных антител к mis-TTR была исследована кристаллическая структура тетрамерного TTR человека, чтобы найти области белка, которые погружены в тетрамере, но становятся экспонированными при диссоциации тетрамера на его мономерные субъединицы. В идентифицированной области были

остатки 89-97 (EHAЕVVFTA) (SEQ ID NO: 42), расположенные в пределах F-цепи TTR и разделенные на границе раздела димера тетрамерного белка. Поиск BLAST в белковой базе данных не выявил каких-либо других человеческих белков, обладающих этой последовательностью.

[00248] Был синтезирован пептид, содержащий эту последовательность (ggEHAЕVVFTAggkg) (SEQ ID NO: 43). Заглавные буквы представляют собой остатки 89-97 TTR. Буквы нижнего регистра представляют собой дополнительные линкерные остатки, добавляемые для увеличения растворимости антигенного пептида, и для создания 9 аминокислотного фрагмента в качестве внутренней последовательности. Этот пептид был присоединён к полилизиновому разветвлённому ядру, образуя многосоставной антигенный пептидный иммуноген (TTR-MAP), содержащий ядро из лизиновых остатков с несколькими ответвлениями, присоединённое к пептиду 89-97 TTR. Антитела, перечисленные в Таблице 2, были получены против TTR-MAP.

[00249] В дополнение к этому многосоставному антигенному пептиду, два других иммуногена, содержащих один и тот же фрагмент TTR, были получены путем ковалентного присоединения аналогичных пептидов 89-97 TTR (Ac-cggEHAЕVVFTA-амид (SEQ ID NO: 44) и Ac-EHAЕVVFTAcgg-амид) (SEQ ID NO: 45) через N- и C-концевые цистеиновые остатки к гемоцианину фиссуреллы (TTR89-97-N-KLH и TTR89-97-C-KLH).

[00250] После создания, скрининга, экспрессии и очистки антител были определены подробные кинетические параметры связывания (скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константа аффинности связывания (K_D)) для «лидирующих» mis-TTR антител посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR - surface plasmon resonance) в паре с рекомбинантным человеческим TTR F87M/L110M, как показано в Таблице 2. Антимышиный IgG (GE Healthcare) был иммобилизован на сенсорном чипе C5 (без цепей декстрана) через аминовое соединение в соответствии с инструкциями, представленными в антимышинном наборе GE Healthcare, а mis-TTR mAb (мышинные антитела к ненативным формам TTR) были захвачены до уровня, чтобы обеспечить максимальное связывание аналита до 30-50 RU (resonance units - резонансных единиц). Различные концентрации аналита (рекомбинантный человеческий TTR F87M/L110M) пропускали через захваченный лиганд при 30 мкл/мин в подвижном буфере (HBS + 0,05% Р-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратных разведениях. Для каждой концентрации реакция протекала в течение времени, позволяющем более высоким концентрациям аналита

достичь равновесия во время ассоциации, а также, по меньшей мере, 10% сигнала до распада во время диссоциации. По меньшей мере одна концентрация (не самая высокая или самая низкая) была проанализирована с дублирующей пробой. Диапазоны концентрации аналита были выбраны на основе предварительных экспериментов, чтобы охватить пределы измерений по меньшей мере от в 10 раз выше K_D до в 10 раз ниже K_D .

[00251] Результаты анализа SPR «лидирующих» mis-TTR mAb приведены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2

SPR анализ связывания антител к mis-TTR с человеческим TTR (F87M/L110M)

mAb	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	R_{max}
9D5	2,715E +4	4,930E-4	1,816E-8	31,55
14G8	2,880E+4	5,358E-4	1,861E-8	27,13
5A1	6,107E + 4	4,693E-4	7,684E-9	30,98
6C1	4,607E+4	4,151E-4	9,010E-9	26,32

Пример 2. Связывание антител к mis-TTR с антигеном TTR

[00252] Четыре «лидирующих» mis-TTR mAb (9D5, 14G8, 6C1 и 5A1) анализировали с помощью ELISA в концентрациях от 0,31 до 2,5 мкг/мл, используя как pH4,0-обработанный TTR (pH4-TTR), так и нативный TTR в качестве покрывающего антигена. Подготовка антигена TTR и протоколы ELISA описаны в других местах, в «Материалы и методы» (e-g).

[00253] Полученные кривые связывания и сведенные значения K_d и V_{max} показаны на Фиг. 3 и в Таблице 3 ниже. Результаты на Фиг. 3 представлены в произвольных единицах (п. е.) по оси y. Все mAb показали значительное связывание с pH4-TTR с величинами K_d в диапазоне от 16 нМ (6C1) до 282 нМ (9D5). Значения V_{max} для связывания с pH4-TTR варьировали от минимума 0,65 п. е. (14G8) до максимума 2,02 (9D5). В отличие от связывания с pH4-TTR, ни одно из антител не показало значительного связывания с нативным TTR, что указывает на то, что все полученные антитела против TTR были специфическими к ненативным формам TTR.

Таблица 3

Анализ ELISA связывания антител к mis-TTR с pH4-TTR

mAb	K_d (nM)	B_{max} (п. е.)
9D5	282	2,02
14G8	108	0,65
6C1	16	1,07
5A1	23	1,61

Пример 3. Анализ антител к mis-TTR с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и нативного ПААГ-электрофореза

[00254] 9D5 и 14G8 были проанализированы с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга, чтобы продемонстрировать специфичность связывания с мономерными/денатурированными формами TTR по сравнению с нативным, неденатурированным TTR. Протоколы ДСН-ПААГ-электрофореза, нативного ПААГ-электрофореза и Вестерн блоттинга описаны в других местах, в «Методы и материалы» (h-j).

[00255] Неденатурированный TTR или pH4-TTR подвергали электрофорезу в геле ДСН-ПААГ наряду с термически денатурированным TTR, и термически денатурированным pH4-TTR. После электрофореза с гелем проводили Вестерн-блоттинг, перенося белки на нитроцеллюлозу и окрашивая mAb 9D5 и 14G8 к TTR. Оба антитела распознавали только TTR, когда он был обработан при pH4, или когда TTR или pH4-TTR сначала подвергали термическому денатурированию до ДСН-ПААГ-электрофореза. Эти 9D5 и 14G8, таким образом, демонстрируют специфичность к конформерам TTR, полученных или денатурацией TTR, или обработкой TTR при pH 4.

[00256] 6C1 и 5A1 вместе с общими mAb (7G7, 8C3) к TTR и коммерчески доступным поликлональным антителом Sigma также анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга. Каждый блот содержал окрашенные маркеры молекулярной массы, неденатурированный TTR и pH4-TTR.

[00257] Окрашенный гель ДСН-ПААГ показал, что основными видами, присутствующими в неденатурированном образце TTR, был димер примерно 38 кДа.

Напротив, основной компонент, присутствующий в образце pH4-TTR, был димером примерно 35 кДа, с небольшой частью димера как мономера примерно 15 кДа. Этот димер проходил как немного меньший белок, чем димер, присутствующий в неденатурированном образце TTR, что указывает на конформационную разницу между этими двумя видами димеров TTR.

[00258] Вестерн-блоттинг образцов TTR и pH4-TTR с использованием четырех антител к mis-TTR показал, что эти mAb не распознают неденатурированный TTR, но связывают как денатурированный мономер, так и димер, присутствующие в образце pH4-TTR. Таким образом, четыре mAb к mis-TTR (9D5, 14G8, 6C1 и 5A1) показывают сходную специфичность для неродственных конформаций TTR при анализе ДСН-ПААГ-электрофорезом/Вестерн-блоттингом.

[00259] В отличие от четырех mAb к mis-TTR, два контрольных TTR mAb, 7G7 и 8C3, полученные путем иммунизации мышей с интактным TTR, распознавали все виды TTR, присутствующие в образцах TTR и pH4-TTR, включая виды тетрамерного TTR. Таким образом, в отличие от mAb к mis-TTR, эти контрольные mAb связывают TTR, но не без конформационной специфичности. Поликлональные антитела Sigma ведут себя аналогично контрольным mAb - 7G7 и 8C3.

[00260] TTR и pH4-TTR также подвергали электрофорезу в нативном геле для того, чтобы увидеть, способны ли четыре mAb к mis-TTR проявлять конформационную специфичность в условиях неденатурирующего геля. На окрашенном нативном геле ПААГ после электрофореза, TTR выглядел как нативный димер примерно 35 кДа с небольшим количеством тетрамера. В отличие от этого, pH4-TTR выглядел в основном как высокомолекулярное размазанное пятно с небольшим количеством димера примерно 35 кДа. Неспецифическое поликлональное антитело Sigma распознавало все формы TTR, присутствующие как в TTR, так и в образце pH4-TTR. В противоположность этому, 9D5 распознает только высокомолекулярные виды TTR, присутствующие в образце pH4-TTR. Как отмечалось в исследовании ДСН-ПААГ-электрофорез/Вестерн-блоттинг, 9D5 не распознает ни одного из нативных видов TTR.

[00261] Все четыре mAb к mis-TTR впоследствии анализировали с помощью нативного ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга. Как и ожидалось, и аналогично 9D5, другие mAb к mis-TTR, 14G8, 6C1 и 5A1, специфически связываются с высокомолекулярными ненативными формами TTR, присутствующими в образце pH4-

TTR. Ни одно из этих антител не распознавало нативный димер TTR размером 35 кДа. Эти результаты указывают на то, что четыре mAb к mis-TTR ведут себя одинаково и распознают только ненативные виды TTR, которые конформационно отличаются от нативного TTR.

Пример 4. Ингибирование образования фибрилл TTR с помощью антител к mis-TTR

[00262] TTR-Y78F представляет собой вариант TTR, содержащий точечную мутацию в позиции 78, которая дестабилизирует тетрамер TTR. Со временем и в мягких кислотных условиях этот вариант TTR диссоциирует на его мономерные субъединицы, которые затем могут сближаться и образовывать фибриллы, способные связываться с тиофлавином-Т. Таким образом, масштаб формирования фибрилл может наблюдаться путем измерения флуоресценции тиофлавина-Т при 480 нм. Введение антитела к mis-TTR, специфичного к диссоциированным мономерам или агрегатам TTR, предотвращает объединение фибрилл TTR, что приводит к уменьшению флуоресценции тиофлавина-Т относительно реакции контроля при отсутствии антитела. Протоколы для оценивания ингибирования формирования фибрилл TTR описаны в других местах, в «Материалы и методы» (к).

[00263] Все четыре антитела к mis-TTR сильно ингибировали образование тиофлавин-Т-реактивных TTR-Y78F-фибрилл по сравнению с изотипическим контролем (результаты показаны на Фиг. 4 и представлены в произвольных единицах (п. е.) по оси у). Антитело 5A1 к mis-TTR почти полностью ингибирует образование фибрилл. Эти результаты согласуются с мнением о том, что антитела к mis-TTR связывают мономерные и/или агрегированные формы TTR, тем самым предотвращая образование фибрилл TTR.

[00264] В Таблице 4 приведены характеристики, полученные для набора из 4 антител к TTR (9D5, 14G8, 6C1 и 5A1), которые показали хорошую конформационную селективность к ненативным формам TTR. Эти антитела имели аффинности (K_D) к pH4-TTR в диапазоне от 14,5 нМ (6C1) до 257 нМ (9D5) и значения B_{max} от 0,65 п. е. (14G8) до 2,02 (9D5). Ни одно из этих антител не распознавало нативный TTR, но на самом деле они связывались с pH4-TTR при ДСН-ПААГ-электрофорезе/Вестерн-блоттинге, и с высокомолекулярными агрегатами TTR при нативном ПААГ-электрофорезе/Вестерн-блоттинге. Эти антитела также ингибировали формирование фибрилл TTR в анализе формирования фибрилл с использованием Thio-T для считывания данных.

Таблица 4

Таблица результатов анализа характеристик mAb к mis-TTR-Y78F

Идентификатор клона	Сэндвич-ELISA (pH4-TTR)		Вестерн-блоттинг			% Ингибирования Фибриллы (Тиофлавин-Т)
	K _D (нМ)	B _{max} (OD ₄₅₀ п. е.)	ДСН-ПААГ электрофорез		Нативный (HMW-TTR)	
			(TTR)	(pH4-TTR)		
9D5	257	2,02	-	+++	+++	83
14G8	98,7	0,65	-	+++	++	65
6C1	14,6	1,07	-	+++	+++	72
5A1	21,3	1,61	-	+++	+++	100

[00265] TTR-V122I представляет собой вариант TTR, содержащий в позиции 122 точечную мутацию, которая дестабилизирует тетрамер. Формирование фибрилл связано с увеличением флуоресценции тиофлавина-Т. Увеличение концентраций mAb 14G8 вызывало монотонное снижение флуоресценции тиофлавина-Т, указывающее на субстехиометрическое ингибирование формирования фибрилл TTR ($IC_{50} = 0,028 \pm 0,009$ мг/мл, $n = 3$, Фиг. 4В и Таблица 4а). Изотипное контрольное mAb не вызывал ингибирования формирования фибрилл TTR (Фиг. 4С), тем самым демонстрируя специфичность опосредованного 14G8 ингибирования.

[00266] Сопоставимые субстехиометрические значения IC_{50} , определенные для 5A1 и 6C1 (Таблица 4а), предполагали аналогичные механизмы ингибирования формирования фибрилл для каждого из этих mAb к mis-TTR. В противоположность этому, 9D5 неожиданно не смог ингибировать формирование фибрилл TTR-V122I, несмотря на то, что проявлял сходную специфичность и сродство к ненативному TTR. Остается изучить, является ли 9D5 более чувствительным к используемым условиям анализа.

Таблица 4а

Таблица результатов анализа характеристик mAb к mis-TTR-Y78F

Антитело	$IC_{50} \pm$ средне- квадратическое отклонение (мг/мл)
9D5	Нет ингибирования
14G8	$0,028 \pm 0,009$
6C1	$0,048 \pm 0,059$
5A1	$0,015 \pm 0,02$
EG 27/1	Нет ингибирования

Пример 5. Иммуногистохимическое определение характеристик ткани, подверженной ATTR, с использованием mAb к mis-TTR

[00267] «Лидирующие» mAb к mis-TTR, созданные к фрагменту белка транстиретина 89-97 TTR, были иммуногистохимически протестированы на свежемороженой и обработанной парафином ткани, взятой у пациентов с подтвержденным сердечным TTR амилоидозом. Протоколы для получения и подготовки образцов сердечной ткани, иммуногистохимии (ИНС - immunohistochemistry) и анализа изображений приведены в других местах, в «Материалы и методы» (I-o). Антитела, используемые для ИНС, описаны в Таблице 5.

Таблица 5

Антитела, примененные для иммуногистохимического определения характеристик

Антитело	Тип антитела	Продавец	Окрашивание сердечной ткани	Концентрация
14G8	mis-TTR	Prothema Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
9D5	mis-TTR	Prothema Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
6C1	mis-TTR	Prothema Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
5A1	mis-TTR	Prothema Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
7G7	TTR	Prothema Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
6F10	Изотипный контроль	Prothema Biosciences	Нет	0,5 мкг/мл
Преальбумин A0002	TTR	Dako North America	Да	1:2 000 и 1:20 000
Каппа-легкие цепи (A0191)	LC-κ	Dako North America	Нет	1:8000
Лямбда-легкие цепи (A0193)	LC-λ	Dako North America	Нет	1:8000
Амилоид А (M0759)	AA	Dako North America	Нет	1:8000

[00268] Образцы сердечной ткани были получены у пациентов с подтвержденными диагнозами мутаций ATTR. Демография для исследуемых иммуногистохимически случаев была следующей и представлена в Таблице 6: FAC = семейная амилоидная

кардиомиопатия; FAP = семейная амилоидная полинейропатия; 1° AL = амилоидоз легкой цепи; ATTR = транстирентин-опосредованный амилоидоз; Unk = Неизвестно

Таблица 6

Иммуногистохимическое окрашивание образцов сердечной ткани с помощью антител к mis-TTR

Пациент	Диагноз	Мутации TTR	Форма	Окрашивалось ли антителами к TTR?
Пациент 1	FAC	Ileu122	Замороженный	Да
Пациент 2	FAP	Дикий тип	Замороженный	Да
Пациент 3	FAP	84Ser	Замороженный	Да
Пациент 4	FAP	84Ser	Замороженный	Да
Пациент 5	1° AL	--	Замороженный	Нет
Пациент 6	1° AL	--	Замороженный	Нет
Пациент 7	ATTR	10Arg	Замороженный	Да
Пациент 8	ATTR	V122I	Замороженный	Да
Пациент H1	ATTR	Val122Ile	FFPE	Да
Пациент H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	Да
Пациент H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	Да
Пациент H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Да
Пациент H5	Unk.	Senile Cardiac	FFPE	Да
Пациент H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Да

[00269] Мышиные моноклональные антитела (mAb к mis-TTR), созданные к фрагменту белка транстирентина 89-97, были иммуногистохимически протестированы на свежемороженой и обработанной парафином ткани, взятой у пациентов с подтвержденным сердечным TTR амилоидозом. Каждое антитело к mis-TTR проявляло иммунореактивность на сердечной ткани с ATTR. Темное окрашивание наблюдалось в отложениях во всем миокарде и сосудистой сети. Когда иммунореактивность сравнивали по окрашиванию Congo Red и тиофлавином-Т, большая часть иммунореактивности на ткани показало высокое соответствие между двулучепреломлением Congo red и Т-положительным окрашиванием тиофлавином. Это подтверждает бета-складчатая природа листа TTR амилоида, отложенного в этой ткани. Эти антитела к mis-TTR также выявляли преамилоидные TTR, которые были локализованы в областях миокарда, что были TTR-иммунопозитивными, но не окрашивались Congo red и тиофлавином-Т. Как контрольное

антитело изотипа IgG, так и первичные пропущенные области антитела были отрицательными для окрашивания во всех тестируемых тканях. Антитела, реакционноспособные по отношению к другим амилоидогенным белкам (легкие цепи лямбда и каппа или амилоид А), были нереакционноспособными на сердечной ткани с ATTR, использованной в этом анализе, что указывает на то, что отложения были специфически характерными для TTR.

[00270] Шаблоны окрашивания антителами к mis-TTR сравнивали с окрашиванием, полученным с хорошо охарактеризованным коммерческим эталонным антителом к TTR (преальбумин, A0002; Dako; Карпинтерия, Калифорния). Контрольное антитело DAKO окрашивало подверженный заболеванию миокард в тех же областях, что и антитела к mis-TTR, но продуцировало более диффузный шаблон окрашивания. Контрольное антитело DAKO не окрашивало конгофильные отложения амилоида TTR, присутствующие в сосудистой сети, так же сильно, как антитела к mis-TTR.

[00271] Антитела к mis-TTR не окрашивали нормальную, не подверженную заболеванию ткань. Кроме того, как и ожидалось, окрашивание изотипным контрольным антителом, 6F10, также было отрицательным.

[00272] Чтобы определить, является ли реакционная способность антител к mis-TTR специфичной по отношению к отложениям TTR, была проанализирована кросс-реакционная способность этих антител к сердечной ткани, полученной от пациентов с диагнозом первичного амилоидоза AL. Как и ожидалось, никакого окрашивания AL-амилоидной ткани не наблюдалось, подтверждая, что антитела к TTR специфически реагируют на подверженную ATTR ткань.

[00273] Сердечная ткань пациентов с подтвержденными диагнозами старческого системного амилоидоза или пациентов с подтвержденным FAS или FAP, вызванных точечными мутациями в гене TTR, также положительно окрашивается 14G8, 9D5, 6C1 и 5A1. Эти результаты показывают, что антитела к TTR обладают способностью распознавать отложения TTR в сердечной ткани независимо от генотипа ATTR.

[00274] Другие несердечные ткани, которые, как известно, экспрессируют TTR, также исследовали на окрашивание 14G8, 9D5, 6C1 и 5A1 и сравнивали с окрашиванием, полученным с использованием эталонного антитела DAKO. Как и ожидалось, печень, поджелудочная железа и сосудистое сплетение окрашивались положительно на TTR с использованием эталонного антитела Dako. В противоположность этому, антитела к mis-

TTR окрашивали только альфа-клетки поджелудочной железы, расположенные в островках Лангерганса, и сосудистое сплетение, что указывает на то, что некоторые из TTR, локализованные в этих органах, конформационно отличаются от TTR, экспрессирующихся в печени. Отсутствие иммунореактивности у mAb к mis-TTR в печени свидетельствует о том, что большое количество TTR, экспрессированного в ней, представляет собой, в основном, тетрамерный, нативный TTR, и не имеет экспонированного эпитопа mis-TTR.

Пример 6. Анализ ATTR в сравнении с плазмой обычного человека с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга и плащечного анализа Meso Scale Discovery (MSD)

[00275] Шесть образцов плазмы от пациентов, з подтвержденным V30M ATTR (образец № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20), и 6 образцов от обычных субъектов (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27) были получены от М. Сарайва (Университет Порту, Португалия). Образец № С6 был обычным образцом человеческой сыворотки, полученным из коммерческого источника (BioreclamationIVT). Образцы анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и Вестерн-блоттинга или с помощью плащечного теста MesoScale Discovery (MSD). Протоколы для этих анализов описаны в других местах, в «Материалы и методы» (p-r). Стандартная кривая была сгенерирована для плащечного анализа MSD с использованием 6C1.

[00276] В полученных Вестерн-блотах с использованием mAb к 9D5 или 5A1 mis-TTR - , различия между нормальными образцами плазмы и TTR-V30M были очевидными. Все образцы плазмы содержали полосу TTR примерно 14 кДа, которая двигалась вместе с ненативным TTR-мономером, присутствующим в эталонном образце pH4-TTR. В общем, образцы плазмы, полученные от пациентов с TTR-V30M (№ 21, 22, 23, 24, 25 и 27), имели больше видов этих mis-TTR. Кроте того, образцы плазмы, полученные от пациентов с V30M, также содержали полосу примерно 30 кДа, которая двигается вместе с ненативным димером TTR, присутствующим в эталонном образце. За исключением образцов № 12 и № 18, образцы плазмы, полученные от обычных особей, обладали меньшим количеством этих димерных видов.

[00277] Полученные Вестерн-блоты были отсканированы, а интенсивности полос комбинированного 9D5- или 5A1-реакционноспособного TTR-димера и мономеров были нанесены на график для каждого образца (результаты показаны на Фиг. 5А (9D5) и 5В

(5A1), и представлены в произвольных единицах (п. е.) по оси у). За исключением образцов плазмы № 15 и № 18, образцы плазмы, полученные от обычных индивидов (11, 12, 19 и 20), содержали меньше 9D5-реакционноспособного димера и мономера, чем образцы, полученные от пациентов с V30M (21-25 и 27).

[00278] 12 образцов сыворотки, проанализированных Вестерн-блоттингом с 9D5 и 5A1, также анализировали с помощью плащечного анализа MSD с использованием 6C1 в качестве антитела для захвата mis-TTR, и антитела Dako-SulfoTag в качестве антитела детектирования. Результаты этих MSD-анализов показаны на Фиг. 6 и представлены в произвольных единицах (п. е.) по оси у. Образцы 11, 12, 15, 18, 19 и 20 представляют собой обычную плазму. Образцы 21-25 и 27 представляют собой плазму больных с V30M.

[00279] За исключением образцов плазмы № 15 и № 18, количество 6C1-реакционноспособного TTR, присутствующего в образцах плазмы, полученных от обычных индивидов, было ниже, чем в плазме у индивидов с TTR-V30M. Уровни реакционной способности 6C1, измеренные с помощью анализа MSD, очень хорошо коррелировали с количеством 9D5-реакционноспособного димера и мономера, наблюдаемых выше с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга.

[00280] Чтобы определить концентрацию реакционноспособных видов TTR, присутствующих в образцах плазмы, те же образцы повторно анализировали с использованием 6C1 в качестве антитела захвата и 8C3-SulfoTag в качестве детектирующего антитела. Сигналы MSD преобразовывали в концентрации нг/мл реакционноспособных видов TTR, используя стандартную кривую TTR F87M/L110M, созданную выше. На основании этого анализа средняя концентрация 6C1-реакционноспособного TTR, присутствующего в контрольных образцах, составляла 271 ± 185 нг/мл. В противоположность этому, средняя концентрация реакционноспособного TTR, присутствующего в образцах плазмы V30M, была выше, на уровне 331 ± 95 нг/мл. Взятые вместе, эти результаты по анализу MSD показывают, что антитела к mis-TTR способны различать образцы с ATTR и образцы обычной плазмы. Это гарантирует дальнейшее улучшение антител к mis-TTR для использования в диагностических тестах болезни ATTR.

Пример 7. Дизайн гуманизированных антител 6C1

[00281] Отправной точкой или донорным антителом для гуманизации было мышинное антитело 6C1. Вариабельная аминокислотная последовательность тяжелой цепи зрелого m6C1 указана как SEQ ID NO: 1. Вариабельная аминокислотная последовательность легкой цепи зрелого m6C1 указана как SEQ ID NO: 13. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи указаны как SEQ ID NO: 10-12, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указаны как SEQ ID NO: 18-20, соответственно. В этом примере используется нумерация Кабата.

[00282] Вариабельная каппа (Vk) антитела m6C1 относится к подгруппе 2 мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 2 человека по Кабату. Вариабельная тяжелая (Vh) антитела m6C1 относится к подгруппе 3d мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 3 по Кабату. Смотрите Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991. CDR-L1 из 16 остатков относится к традиционному классу 4, CDR-L2 из 7 остатков относится к традиционному классу 1, а CDR-L3 из 9 остатков относится к традиционному классу 1 в Vk. Смотрите Martin & Thornton, *J. Mol. Biol.* 263:800-15, 1996. CDR-H1 из 10 остатков (составная CDR-H1 по Чотиа-Кабату, остатки 26-35 как показано в Таблице 7) относится к традиционному классу 1, и CDR-H2 из 17 остатков относится к традиционному классу 1. Смотрите Martin & Thornton, *J. Mol. Biol.* 263:800-15, 1996. CDR-H3 не имеет традиционных классов.

[00283] Остатки в зоне взаимодействия доменов Vk и Vh являются такими, какие обычно можно наблюдать.

[00284] Был проведен поиск по белковым последовательностям в базе данных PDB (Deshpande *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7, 2005), чтобы найти структуры, которые предоставили бы грубую структурную модель 6C1. Кристаллическая структура антитела fab (pdb-код 3EYS) (Gardberg *et al.*, *Biochemistry* (2009) Vol. 48(23), pp. 5210-5217) была использована для структуры Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (1,95 Å), предельное сходство последовательности с 6C1 Vk и сохраняла ту же каноническую структуру для петель, что и 6C1. Для структуры Vh использовали димерное антитело (pdb-код 2OTU) (Li *et al.*, Submission to GenBank (2007)), поскольку оно имело хорошее сходство и разрешение (1,68 Å), и содержало те же канонические структуры для CDR-H1 и CDR-H2, как у VH 6C1. Программное обеспечение BioLuminate (лицензия от Schrodinger Inc.) использовалось для моделирования грубой структуры 6C1.

[00285] Поиск базы данных из NCBI, не содержащей избыточных белковых последовательностей, позволил выбрать подходящие каркасы антитела человека для переноса CDR мыши. Для Vh была выбрана тяжелая цепь ADX65650 человеческого Ig (GI: 323432015) (SEQ ID NO: 3) (Scheel *et al.*, Submission to GenBank (2010)). Она имеет традиционную форму, как и в 6C1. Для Vk была выбрана легкая каппа-цепь человека с идентификационным номером NCBI ABI74084 (GI: 114385652) (SEQ ID NO: 15) (Shriner *et al.* Submission to GenBank (2006)). Она имеет такие же традиционные классы для CDR-L1 и L2, как те же в первичноq Vk.

[00286] Были сконструированы шесть вариантов вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи и два варианта вариабельной области гуманизированной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен (Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3 и Hu6C1VHv3b (SEQ ID NO: 4-9 соответственно) и Hu6C1VLv1-2 (SEQ ID NO: 16 и 17 соответственно)) (Таблицы 7 и 8). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vh и Vk с обратными мутациями и другими мутациями, на основе выбранных человеческих каркасов показаны в Таблицах 7 и 8 соответственно. Заштрихованные серым области в первом столбце в Таблицах 7 и 8 обозначают CDR, как определено по Чотиа, а заштрихованные серым в остальных столбцах в Таблицах 7 и 8 обозначают CDR, как определено по Кабату. SEQ ID NO: 4-9, 16 и 17 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в Таблице 9. Аминокислоты в позициях L2, L45, H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83 и H89 в Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3 и Hu6C1VHv3b и в Hu6C1VLv1-2 перечислены в Таблице 10.

Таблица 7
Гуманизированные области Vh антитела 6C1

№ остатка по Чюта	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	FR или CDR	VH 6C1 (SEQ ID NO: 1) мыши	Hu VH Acceptor Fr Acc № ADX65650 (SEQ ID NO:3)	6C1 VHv1 (SEQ ID NO:4)	6C1 VHv1b (SEQ ID NO:5)	6C1 VHv2 (SEQ ID NO:6)	6C1 VHv2b (SEQ ID NO:7)	6C1 VHv3 (SEQ ID NO:8)	6C1 VHv3b (SEQ ID NO:9)
1	1	1	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	R	R	R	R	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR- H1	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR- H1	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR- H1	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR- H1	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR- H1	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR- H1	N	S	N	N	N	N	N	N
32	32	32	CDR- H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR- H1	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	34	CDR- H1	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR- H1	S	N	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R

Таблица 7
Гуманизированные области Vh антитела 6C1

39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	A	A	A	A	A	A
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	G	G	G	G	G	G
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	G	G	G	G	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	S	A	S	A	S	A
50	50	50	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR-H2	I	S	I	I	I	I	I	I
53	53	54	CDR-H2	D	S	D	D	D	D	D	D
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	N	S	N	N	N	N	N	N
56	56	57	CDR-H2	N	T	N	N	N	N	N	N
57	57	58	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	H	Y	H	H	H	H	H	H
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K

Таблица 7
Гуманизированные области Vh антитела 6C1

76	76	77	Fr3	N	N	N	N	S	S	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	N	N	S	S	N	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	R	R	R	R	K	K
84	84	88	Fr3	S	A	A	A	A	A	A	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	V	V	V	V	M	M
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	D	D	D	D	D	D	D	D
96	96	100	CDR-H3	S	L	S	S	S	S	S	S
97	97	101	CDR-H3	D	S	D	D	D	D	D	D
98	98	102	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	S	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
100G	100G	105	CDR-H3	F	Y	F	F	F	F	F	F
101	101	106	CDR-H3	D	G	D	D	D	D	D	D
102	102	107	CDR-H3	V	Y	V	V	V	V	V	V
103	103	108	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	109	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	110	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	111	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	113	Fr4	T	L	L	L	L	L	L	L
109	109	114	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	115	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	116	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	117	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	118	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 8
Гуманизированные области V_κ 6C1 антитела

№ остатка по Чотиа	№ остатка по Кабаты	Линейный № остатка	FR или CDR	VL 6C1 мыши (SEQ ID NO: 13)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABI74084 (SEQ ID NO: 15)	6C1 VLv1 (SEQ ID NO: 16)	6C1 VLv2 (SEQ ID NO: 17)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	V	I	V	I
3	3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	T	T	T	T
8	8	8	Fr1	P	P	P	P
9	9	9	Fr1	L	L	L	L
10	10	10	Fr1	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	S	T	T	T
15	15	15	Fr1	L	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	D	E	E	E
18	18	18	Fr1	Q	P	P	P
19	19	19	Fr1	A	A	A	A
20	20	20	Fr1	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	S	S	S	S
27	27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	I	L	I	I
27C	27C	30	CDR-L1	V	L	V	V
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	S	S	S
28	28	33	CDR-L1	N	N	N	N
29	29	34	CDR-L1	G	G	G	G
30	30	35	CDR-	N	Y	N	N

Таблица 8
Гуманизированные области V_κ 6C1 антитела

			L1				
31	31	36	CDR-L1	T	N	T	T
32	32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
33	33	38	CDR-L1	L	L	L	L
34	34	39	CDR-L1	E	D	E	E
35	35	40	Fr2	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y
37	37	42	Fr2	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	R	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	K	Q	K	K
46	46	51	Fr2	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	K	L	K	K
51	51	56	CDR-L2	V	G	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	K	N	K	K
54	54	59	CDR-L2	R	R	R	R
55	55	60	CDR-L2	F	A	F	F
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D
61	61	66	Fr3	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	D	D	D	D
71	71	76	Fr3	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	I	T	T	T

Таблица 8
Гуманизированные области V_k 6C1 антитела

73	73	78	Fr3	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	L	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	F	M	F	F
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	G	G	G	G
92	92	97	CDR-L3	S	L	S	S
93	93	98	CDR-L3	H	Q	H	H
94	94	99	CDR-L3	V	T	V	V
95	95	100	CDR-L3	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	G	G	G	G
101	101	106	Fr4	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	V	V	V
105	105	110	Fr4	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K

Таблица 9

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L

Вариант V _H или V _L	Последовательность экзона акцептора V _H или V _L	Остатки каркаса донора
Hu6C1VHv1 (SEQ ID NO: 4)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H77
Hu6C1VHv1b (SEQ ID NO: 5)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H49, H77
Hu6C1VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H49, H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H19, H44, H77, H83, H89
Hu6C1VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Идентификационный номер NCBI ADX65650 (SEQ ID NO: 3)	H19, H44, H49, H77, H83, H89
Hu6C1VLv1 (SEQ ID NO: 16)	Код доступа NCBI ABI74084 (SEQ ID NO: 15)	L2, L45
Hu6C1VLv2 (SEQ ID NO: 17)	Код доступа NCBI ABI74084 (SEQ ID NO: 15)	L45

Таблица 10

Нумерация остатков каркаса по Кабату
для обратных мутации и других мутаций в гуманизированных
антителах 6C1

Остаток	Тяжелая цепь ADX65650	ABI74084 Легкая цепь	6C1 мыши	Hu6C1 VHv1	Hu6C1 VHv1b	Hu6C1 VHv2	Hu6C1 VHv2b	Hu6C1 VHv3	Hu6C1 VHv3b	Hu6C1 VLv1	Hu6C1 VLv2
L2	-	I	V	-	-	-	-	-	-	V	I
L45	-	Q	K	-	-	-	-	-	-	K	K
H19	R	-	K	R	R	R	R	K	K	-	-
H44	G	-	R	G	G	G	G	R	R	-	-
H49	S	-	A	S	A	S	A	S	A	-	-
H76	N	-	N	N	N	S	S	N	N	-	-
H77	S	-	T	T	T	T	T	T	T	-	-
H82(a)	N	-	S	N	N	S	S	N	N	-	-
H83	R	-	K	R	R	R	R	K	K	-	-
H89	V	-	M	V	V	V	V	M	M	-	-

[00287] Выравнивание последовательности Vh 6C1 мыши (SEQ ID NO: 1) с модельной последовательностью мыши (2 OUT_B.pro; SEQ ID NO: 2), акцепторной

последовательностью человека (ADX65650, SEQ ID NO: 3) и последовательностями Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3 и Hu6C1VHv3b (SEQ ID NOS: 4-9 соответственно) показано на Фиг 1. Области CDR, определенные по Кабату, затенены. Позиции, в которых традиционные, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 2, 49, 69, 71, 75, 78 и 94 по Кабату в Таблице 7. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 24, 48 и 73 по Кабату в Таблице 7. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 37, 39, 45, 47, 91, 93 и 103 по Кабату в Таблице 7.

[00288] Выравнивание последовательности Vk 6C1 мыши (SEQ ID NO: 13) с модельной последовательностью мыши (3EYS_L_St.pro; SEQ ID NO: 14), акцепторной последовательностью человека (ABI74084, SEQ ID NO: 15) и последовательностями Hu6C1VLv1 и Hu6C1VLv2 (SEQ ID NOS: 16 и 17 соответственно) показано на Фиг. 2. Области CDR, определенные по Кабату, затенены. Позиции, в которых традиционные, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 4, 35, 46, 49, 66, 68 и 69 по Кабату в Таблице 8. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 2, 48, 64 и 71 по Кабату в Таблице 8. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 36, 38, 44, 87 и 98 по Кабату в Таблице 8.

[00289] Обоснования выбора позиций, указанных в Таблицах 9 и 10, в вариательной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, следующие.

[00290] I2V: Это канонический взаимодействующий остаток CDR. Более громоздкая боковая цепь Ile потенциально может помешать упаковке L1 и L2 CDR. Этот остаток обратно мутируют в Val в Hu6C1VH1.

[00291] Q45K: Lys чаще встречается в этой позиции, чем Gln в последовательности человека; поэтому это обратная мутация, зависящая от частоты.

[00292] Обоснования выбора позиций, указанных в Таблицах 9 и 10, в вариательной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, следующие.

[00293] R19K: Lys образует Н-связи с соседними остатками, тогда как Arg не образует.

[00294] G44R: Arg образует Н-связи с остатком Phe98 интерфейса в легкой цепи, тогда как Gly - не образует.

[00295] S49A: Ser может потенциально образовывать Н-связь с Hys в CDR-H2.

[00296] N76S: По этому остатку наблюдается высокая степень дезамидирования. Ser является вторым наиболее частым в этой позиции в клетках зародышевой линии человека.

[00297] S77T: Серин в этой позиции очень редок в каркасах тяжелой цепи клеток зародышевой линии человека, тогда как треонин наиболее часто встречается в позиции 77. Эта обратная мутация была сделана для смягчения любого потенциала иммуногенности.

[00298] N82(a)S: По этому остатку наблюдается высокая степень дезамидирования. Ser является вторым наиболее частым в этой позиции в клетках зародышевой линии человека.

[00299] R83K: Lys в этой позиции вступает во множество взаимодействий с соседними остатками, оказывающими стабилизирующее действие на петлю, тогда как Arg не вступает.

[00300] V89M: Met образует Н-связи с интерференционным остатком Tyr91 и, видимо, стабилизирует интерфейс, тогда как Val не взаимодействует с Tyr91.

[00301] Два варианта вариабельной области гуманизированной легкой цепи, и два варианта вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи:

[00302] Hu6C1VL вариант 1 (обратные мутации I2V и Q45K показаны нижним регистром):

DvVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS KRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:16)

[00303] Hu6C1VL вариант 2 (обратная мутация Q45K показана нижним регистром):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS KRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:17)

[00304] Hu6C1VH вариант 1 (обратная мутация S77T показана нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSYISIDGNNIY
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS
S (SEQ ID NO:4)

[00305] Hu6C1VH вариант 1b (обратные мутации S49A и S77T показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVaYISIDGNNIY
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS
S (SEQ ID NO:5)

[00306] Hu6C1VH вариант 2 (обратные мутации N76S, S77T и N82(a)S показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSYISIDGNNIY
HPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQM_sSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:6)

[00307] Hu6C1VH вариант 2b (обратные мутации S49A, N76S, S77T и N82(a)S показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVaYISIDGNNIY
HPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQM_sSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:7)

[00308] Hu6C1VH вариант 3 (обратные мутации R19K, G44R, S77T, R83K и V89M показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKtLEWVSYISIDGNNIY
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS
S (SEQ ID NO:8)

[00309] Hu6C1VH вариант 3b (обратные мутации R19K, G44R, S49A, S77T, R83K и V89M показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGK_rLEWVaYISIDGNNIYH
 PDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO:9)

Пример 8. Кинетический анализ связывания гуманизированных антител 6C1

[00310] Кинетика связывания гуманизированных антител 6C1, содержащих тяжелую цепь, выбранную из варианта 3b, и легкую цепь, выбранную из варианта 2, характеризовали с помощью Biacore, и она продемонстрирована ниже.

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max}
Hu-6C1-H3bL2	3,724E + 5	5,449E-4	1,463E-9	38,80

Пример 9. Материалы и способы

a. Протокол создания антител

[00311] Мышей иммунизировали еженедельно антигенными пептидами TTR-MAP, TTR89-97-N-KLH или TTR89-97-C-KLH в адъюванте RIBI, или ежемесячно в адъюванте TiterMax. За три-четыре дня до гибридизации, иммунитет выбранных мышей стимулировали четвертый раз иммуногеном в физиологическом растворе. Селезенку гомогенизировали для получения спленоцитов, и их гибридизировали с клетками миеломы SP2/0 с использованием стандартного протокола электрогибридизации. Гибридные клетки в селективной среде высевали в 96-луночные плашки и подвергали скринингу через 7-10 дней.

б. Протокол скрининга антител

[00312] Отбор гибридомы основывался на следующем скрининге с помощью ELISA: 96-луночные плашки ELISA покрывали куриным анти-His, 1 мкг/мл ФСБ и инкубировали в течение 1 часа. Плашки блокировали 1% раствором БСА/ФСБ, 200 мкл/лунка в течение 15 минут, затем добавляли 0,5 мкг/мл рН4-TTR, 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа. рН4-TTR представляет собой TTR который подвергли воздействию низкого рН (50 мМ ацетата натрия, рН 4,0) для того, чтобы диссоциировать/агрегировать TTR с целью экспонировать эпитоп TTR89-97. Плашки дважды промывали TBS-T. Добавляли супернатант из плашек гибридизации, 50 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 часа. Плашки дважды промывали TBS-T. Добавляли антитело обнаружения, козье-антимышиное (IgG1, 2а, 2b, 3 специфичное)-HRP, разбавленное 1:5000 в 0,5% БСА/ФСБ/TBS-T, 50 мкл/лунка, и инкубировали в течение 1 часа. Наконец, плашки промывали пять раз субстратом TBS-T и TMB, добавляли 100 мкл/лунка. Через 15 минут проявление субстрата останавливали 2N серной кислотой, 50 мкл/лунка. Плашки считывали при 450 нм. Были выбраны лунки с OD > 1,0, и клетки переносили в 24-луночную плашку. Через 3 дня роста клоны подвергали вторичному (counter) скринингу с помощью вышеуказанного анализа для подтверждения связывания, и заменяя нативный TTR на рН4-TTR в качестве отрицательного вторичного скрининга, что позволяет выбирать клоны, продуцирующие mAb к TTR, специфичные к ненативным формам TTR.

с. Протоколы экспрессии антител

[00313] Плазмиды с легкой цепью и тяжелой цепью, под контролем CMV, несущие гуманизированные последовательности моноклональных антител, трансфицировали в клетки CHO-S1 (Life Technology). Чтобы создать выборочный пул был применен двойной отбор. Частично использованную клетками среду анализировали по титру, связывали и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга. Выбранные пулы использовались для создания клонов с применением системы Clonепix (Molecular Devices). Клоны были ранжированы на основе титра антител. Выбранные клоны были размножены, и были созданы их стоки.

[00314] Самый высокопродуктивный клон размножали во встряхиваемых колбах, и культуру использовали для инокуляции 10-25-литровых одноразовых биореакторов (Wave). Смесь сред экспрессии FreeStyle-CHO, CD OptiCHO и FreeStyle F17, дополненных Glutamax (среда и Glutamax от Life Technology), использовали в

встряхиваемых колбах, а также для культур в одноразовых биореакторах. Одноразовую (batch) культуру получали с использованием одноразового биореактора (GE Healthcare) при 37°C, 7% CO₂ при постоянном перемешивании. Образцы периодически отбирали для контроля количества клеток, жизнеспособности и продуцирования антител. При необходимости вносили добавку Cell Boost (HyClone). Одноразовую культуру собирали, когда жизнеспособность клеток начинала становится ниже 90% (5-7 дней).

d. Протокол очистки антител

[00315] Культуру клеток собирали после того, как сперва позволяли клеткам в суспензии оседать на дно одноразового биореактора под действием силы тяжести при 4°C. Собранную среду очищали через поровый фильтр (Millistak Pod CONC, Millipore), концентрировали 10-кратно с помощью фильтрования тангенциальным потоком (Pelicon 2PLC 30K, Millipore) и стерильно фильтровали через фильтр 0,2 мкм (Opticap XL, Millipore). Концентрированную частично использованную клетками среду затем загружали в колонку Protein G Sepharose Fast Flow (GE Lifesciences), предварительно уравновешенную в 1хФСБ, pH 7,4, используя FPLC (Akta Avant, GE Lifesciences). Несвязанные белки смывали с колонки 5-10 объемами колонки 1хФСБ, pH 7,4 до достижения OD₂₈₀ исходного уровня. Связанное антитело элюировали из колонки 2 объемами колонки IgG Elution Buffer (Thermo Scientific). Фракции элюата собирали, и делали pH нейтральным с помощью 2М-ного Tris, pH 9,0 (60 мкл на 1 мл элюата).

[00316] Антителосодержащие фракции объединяли и диализовали в течение ночи при 4 °C против 1хФСБ, pH 7,4. Затем диализованный образец стерилизовали ультрафильтрацией через 0,2 мкм PES-фильтр и хранили при 4 °C. Конечную концентрацию белка определяли бицинхониновой кислотой (BCA - bicinchoninic) с использованием бычьего гамма-глобулина в качестве стандарта белка (Thermo Scientific).

e. Протоколы экспрессии и очистки рекомбинантного TTR

[00317] Клетки *E. coli* (BL21-A1) трансформировали плазмидой pET21a(+), содержащей вставку TTR (Met-hTTR-(His)₆ или вариант TTR, содержащий двойную мутацию F87M/L110M. Клетки выращивали в бульоне 2YT, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию TTR индуцировали в течение ночи при 20 °C в присутствии 1 mM IPTG и 0,05% арабинозы.

[00318] Клетки собирали центрифугированием при 4000×g в течение 10 мин. И хранили при -80°C до использования. 10-15 г клеточных гранул оттаивали и лизировали в 50 мл буфера А (1×ФСБ, содержащий 500 mM NaCl, 20 mM имидазола) путем использования высокоскоростного прибора измельчения LV-1 (Microfluidics, Inc.). Лизированные клетки центрифугировали при 12,000 x g в течение 15 мин, фильтровали через 0,2 мкм PES-фильтр перед очисткой на колонке His-Trap HP (GE Lifesciences). После загрузки, колонку промывали 10 объемами колонки буфером А и элюировали буфером В (1×ФСБ 500 mM NaCl, 500 mM имидазол). Пиковые фракции, соответствующие TTR, собирали, диализовали против 1×ФСБ и хранили при -80° C до использования.

f. Приготовление антигена TTR

[00319] Нативный антиген TTR готовили путем разбавления концентрированного стока рекомбинантного TTR-6His до конечной концентрации 2,5 мкг/мл буфером 1×ФСБ. Обработанный pH4 TTR получали путем инкубации рекомбинантного TTR в 50 mM ацетате натрия в концентрации 0,2 мг/мл, pH 3,95, в течение 72 часов при комнатной температуре. В этих условиях TTR диссоциирует на смесь мономеров и агрегированных форм TTR, которые структурно отличаются от нативного TTR. pH4-TTR затем разбавляли до конечной концентрации 2,5 мкг/мл в 1×ФСБ непосредственно перед использованием в анализе. 96-луночные плашки (Costar № 3690) покрывали куриным анти-his поликлональным антителом при комнатной температуре 50 мкл/лунка 1,0 мкг/мл (Abcam № Ab9107) в 1×PBS в течение 1 часа. Раствор для покрытия отбрасывали и плашку блокировали 250 мкл/лунка 1× БСА-содержащего блок-буфера, разбавленного в 1×ФСБ (G-Biosciences № 786-193) в течение 1 часа.

g. Протокол ELISA

[00320] Покрытые и заблокированные 96-луночные плашки обрабатывали TTR-антигеном 50 мкл на лунку 2,5 мкг/мл (либо нативный TTR, либо pH4-TTR) в течение 1

часа при комнатной температуре. Плашки затем дважды промывали 250 мкл/лунка промывочного буфера (1xТрис-буферный солевой раствор, содержащий 0,05% Tween-20). Затем промытые плашки обрабатывали 50 мкл/лунка соответствующего моноклонального антитела против TTR в концентрациях от 0,31 до 2,5 мкг/мл в течение 1 часа.

[00321] Обработанные плашки промывали 3 раза 250 мкл/лунка промывочного буфера. После промывки, плашки обрабатывали в течение 1 часа 50 мкл/лунка детектирующего антитела, содержащего разведенное 1:5000 в 1xФСБ пероксид-конъюгированное антитело козел-анти-мышь (Jackson ImmunoResearch № 115-035-164). Затем плашки промывали 3 раза перед добавлением 100 мкл субстрата ТМВ/лунка (Rockland). Реакции HRP разрешали продолжаться при комнатной температуре в течение 15 мин. до гашения (quenching) 50 мкл 1N H₂SO₄ на объем лунки. Спектроскопическая абсорбция измерялась при длине волны равной 450 нм.

h. ДСН-ПААГ электрофорез

[00322] Электрофорез в ДСН-полиакриламидных гелях проводили следующим образом. 0,1-1 мкг TTR или pH 4,0-TTR в буфере для образцов 1xLDS (Life Technologies) загружали на 10% -ный гель NusPage bis-tris и подвергали электрофорезу в буфере MES при постоянных 90В в течение 105 минут. После электрофореза гель или окрашивали в Instant Blue (Expedeon), или переносили на нитроцеллюлозные фильтры для Вестерн-блоттинга.

i. Нативный ПААГ электрофорез

[00323] Электрофорез на нативных Трис-глициновых гелях проводили следующим образом. 0,1-1 мкг TTR или pH 4,0 TTR в 1xТрис-глициновом (Life Technologies) буфере для образцов загружали в 10-20% Трис-глициновый-гель и подвергали электрофорезу в 1x нативном Трис-глициновом буфере пробега при постоянных 120В в течении 105 минут. После электрофореза гель или окрашивали в Instant Blue (Expedeon), или переносили на нитроцеллюлозные фильтры для Вестерн-блоттинга.

j. Вестерн-блоттинг

[00324] ДСН- или нативный ПААГ гели были блоттированы на нитроцеллюлозную фильтровальную бумагу (iBlot, программу P7) и заблокированы буфером для блокировки (Licor) в течение 30 минут. Затем фильтры инкубировали в 0,5 мкг/мл первичного антитела в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре (или в течение ночи при 4 ° C), а затем следовали три промывки 1xTBS, каждая по 10 минут.

Фильтры помещали в IRDye 800CW-конъюгированное коза-анти-мышь вторичное антитело, разбавленное 1:20000 в буфере для блокирования. После инкубации фильтров в растворе вторичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре фильтры промывали и отображали на инфракрасном тепловизоре Odyssey CLx (Licor).

k. Протокол анализа формирования фибрилл TTR

[00325] Раствор 3,6 мкМ (0,2 мг/ мл) TTR-Y78F в 50 мМ ацетате натрия, pH 4,8, инкубировали при 37°C в течение 72 часов в присутствии 1,4 мкМ (0,2 мг/мл) антитела к mis-TTR или с изотипным контролем. После инкубации к смеси добавляли 5X молярный избыток тιοфлавина-Т и оставляли связываться в течение 30 минут. Флуорометрические измерения проводили при длине волны излучения равной 480 нм с длиной волны возбуждения, установленной на 440 нм. Ингибирование равное 0 % устанавливали, как интенсивность флуоресценции в присутствии изотипного контрольного антитела (83 п. е.), и точку 100%-ного ингибирования устанавливали, как флуоресценцию в отсутствие белка TTR-Y78F (38 п. е.).

l. Образцы сердечной ткани

[00326] Свежезамороженные и обработанные парафином блоки сердечной ткани с подтвержденными диагнозами мутаций ATTR были получены от доктора Меррилл Бенсона в Университете Индианы. Образцы включали восемь свежих замороженных образцов и шесть образцов FFPE, и для каждого образца был поставлен диагноз ATTR или какой-либо другой сердечный амилоидоз. Диагноз для ткани был дополнительно подтвержден в Prothema с помощью окрашивания ИHC антителами к каппа и лямбда-легким цепям и амилоиду A перед исследованием антител TTR.

m. Иммуногистохимия

[00327] Иммуногистохимия была выполнена на слегка закрепленных параформальдегидом, 10 мкм криосрезах и на 5 мкм парафиновых срезах. Способ с иммунопероксидазой был основной системой детектирования, которое было выполнено на Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Буффало-Гроув, Иллинойс) с использованием набора для определения Refine Bond Polymer Refine Detection Kit (DS980, Leica Biosystems). Первичные антитела инкубировали в течение одного часа (в соответствии с концентрациями в Таблице 2) с последующей инкубацией с конъюгатами антител анти-мышь и анти-кролик с полимерным HRP-линкером. Окрашивание визуализировали с

помощью хромогена DAB, который продуцировал коричневый осадок. Микропрепараты докрашивали гематоксилином, обезвоживали в восходящей серии спиртов, очищали в ксилолах и накрывали покрывным стеклом CytoSeal 60 (Richard Allen Scientific, Каламазу, Мичиган). Отрицательный контроль заключался в проведении всей иммуногистохимической процедуры на срезах соседних участков ткани с неиммунным изотипным контролем IgG или с отсутствием первичного антитела.

п. Обнаружение амилоида: окраска Congo Red и тиюфлавином-Т

[00328] Окрашивание Congo red проводили для обнаружения амилоида TTR в ткани применяя набор от American MasterTech (Лоди, Калифорния). Окрашивание проводили в соответствии с процедурой рекомендованной изготовителем. Микропрепараты окрашивали раствором Congo Red в течение 1 часа с последующей дифференциацией в 1%-ном гидроксиде натрия в течение примерно 15 секунд. Затем микропрепараты ополаскивали в проточной воде, обезвоживали с помощью серии спиртов с возрастающими концентрациями, и очищали с помощью трех смен ксилолов, и накрывали покрывным стеклом CytoSeal 60.

[00329] Для определения присутствия амилоида TTR в ткани использовали модифицированный протокол окрашивания тиюфлавином-Т (Schmidt et al., 1995). Если коротко, микропрепараты докрашивали с помощью гематоксилина Маера, промывали проточной водой и окрашивали отфильтрованным 0,015% раствором тиюфлавина-Т (T3516-25G, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в 50% этаноле в течение десяти минут. Затем микропрепараты промывали в проточной воде и дифференцировали в 1% (об./об.) уксусной кислоте в течение 10 минут и промывали три раза в воде. Микропрепаратам разрешали высохнуть на воздухе до того, как они были покрыты ProLong Gold (Life Technologies).

о. Анализ изображений

[00330] Микропрепараты визуализировали или с помощью микроскопа Olympus BX61, или с помощью цифрового сканера микропрепаратов Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT, либо спектральной конфокальной системы Leica SPE. Изображения собирали и сохраняли в виде файлов TIFF.

р. Анализ образцов плазмы человека с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга

[00331] Шесть образцов плазмы от пациентов, з подтвержденным V30M ATTR (образец № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20), и 6 образцов от обычных субъектов (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27) были получены от М. Сарайва (Университет Порту, Португалия). Образец № С6 был обычным образцом человеческой сыворотки, полученным из коммерческого источника (BioreclamationIVT). Эти образцы плазмы разделяли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, и проводили Вестерн-блоттинг с 9D5 следующим образом. Объем плазмы равный 1,4 мкл разбавляли 1:8 в 1xLDS буфер для образца в отсутствие восстановителя (Life Technologies). Образцы подвергали разделению с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, и Вестерн-блоттингу с использованием 0,5 мкг/мл 9D5 как описано ранее.

q. Анализ образцов плазмы человека с помощью планшетного анализа MesoScale Discovery (MSD)

[00332] 96-луночные плашки MSD покрывали моноклональным антителом 6C1 в концентрации 4 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре со встряхиванием, или в течение ночи при 4 ° С. Плашки промывали три раза 1×TBST перед блокировкой 3% раствором MSD Blocker A, 150 мкл/лунка в течение 1 часа встряхивания. К заблокированным плашкам MSD добавляли 30 мкл на объем лунки образцов человеческой плазмы, разведенных 1:10 в буфере для образцов, состоящем из 0,6% бычьего сывороточного альбумина без глобулинов, 1,5 мМ одноосновного фосфата натрия, 8 мМ двухосновного фосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия, 0,05% Triton X- 405 и 0,05% тимеросала, на 1 часа. Плашки промывали 3 раза 1×TBST. На 1 час добавляли 50 мкл на объем лунки 1 мкг/мл сульфомеченного детектирующего антитела (или 8C3 антитело к всем TTR, или поликлональное антитело Dako) в буфере для образцов при комнатной температуре со встряхиванием. Плашки промывали три раза 1xTBST с последующим добавлением 150 мкл/лунка раствора 1X Read Buffer T (Meso Scale Discovery). Плашки затем считали устройством визуализации MSD Sector.

г. Построение стандартной кривой MSD

[00333] Чтобы количественно определить количество ненативного 6C1-реакционноспособного TTR-белка, присутствующего в образцах плазмы человека, стандартную кривую MSD строили с использованием рекомбинантного TTR-F87M/L110M в качестве 6C1-реакционноспособного стандарта TTR. Этот вариант TTR содержит две аминокислотные замены, которые препятствуют образованию тетрамеров и удерживают

белок в мономерном состоянии (Jiang et al. (2001) Biochemistry 40, 11442-11452). Таким образом, этот вариант TTR распознается всеми mAb к mis-TTR и поэтому хорошо подходит для использования в качестве эталонного стандарта в анализе MSD.

[00334] Чтобы получить стандартную кривую 96-луночные плашки MSD покрывали антителом 6C1 к mis-TTR в концентрации 4 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре со встряхиванием, или в течение ночи при 4 ° C. Плашки промывали три раза 1×TBST перед блокировкой 3% раствором MSD Blocker A, 150 мкл/лунка в течение 1 часа встряхивания. Заблокированные плашки затем обрабатывали в течение 1 часа 50 мкл/лунка 25 мкг/мл TTR-F87M/L110M, серийно разведенного 1:5, причем последнее разбавление стало буферным контролем. Плашки промывали 3 раза 1×TBST перед добавлением 50 мкл/объем лунки 1 мкг/мл антитела SulfoTag-обнаружения (8C3-SulfoTag или Dako pAb-SulfoTag) в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Как mAb 8C3, так и Dako были с присоединённым SulfoTag, и могли быть использованы в качестве детектирующего антитела, поскольку они связываются с любым TTR и не являются конформационно специфичными.

[00335] После обработки детектирующим антителом плашки трижды промывали 150 мкл 1×TBST на объем лунки, с последующим добавлением 150 мкл/лунка 1× Read Buffer T (MSD). Плашки считывали в средстве визуализации изображений MSD, и строили калибровочную кривую TTR F87M/L110M.

Пример 10. Оценка антител к mis-TTR в модели трансгенных мышей

[00336] Исследования *in vivo* проводятся на модельной гуманизированной трансгенной мыши V30M hTTR (Inoue et al., (2008) Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. Transgenic Research 17:817-826) для оценки эффективности связывания и удаления агрегированного hTTR анти-TTR-антителами.

[00337] Трансгенных мышей разводят с использованием стандартных процедур, и уровни их циркулирующего hTTR оценивают с помощью ELISA. Для последующих исследований эффективности используют мышей с количеством hTTR в сыворотке равным 200-400 мкг/мл. В первом блоке исследований изучают естественное отложение hTTR у трансгенных мышей. Обнаружение отложений hTTR начинают в возрасте 12 месяцев и повторяют каждые 3-6 месяцев после этого. Исследования эффективности начинают, когда у трансгенных мышей наблюдается приемлемое количество агрегатов.

Животных делят на три группы лечения (n=10/группа) и обрабатывают еженедельно в течение четырех недель внутрибрюшинной дозой переносчика, контрольного антитела (изотипный контроль, 10 мг/кг тела) или антитела против hTTR (10 мг/кг тела). Через неделю после последней обработки мышей подвергают эвтаназии, ткани собирают и обрабатывают, а затем окрашивают для того, чтобы оценить количество и размер оставшихся отложений TTR. Используют количественные способы и статистику для определения уровня клиренса, наблюдаемого между группами.

[00338] В альтернативном подходе агрегаты hTTR готовят *in vitro* и затем вводят в почку трансгенных мышей для затравки отложения новых агрегатов. Заявитель определил, что инъекция этих препаратов может ускорить отложение новых агрегатов предсказуемым образом. Основываясь на этих выводах, животных усыпляют, оголяют левую почку, и вводят в корковое вещество почки предварительно агрегированный hTTR-материал. После соответствующего периода восстановления, мышей делят на три группы лечения (n=10/группа), и обрабатывают еженедельно в течение четырех-восьми недель внутрибрюшинной дозой переносчика, контрольного антитела (изотипный контроль, 10 мг/кг тела) или антитела против hTTR (10 мг/кг тела). Через неделю после последней обработки мышей подвергают эвтаназии, почки собирают и обрабатывают, а затем окрашивают для того, чтобы оценить количество и размер отложений TTR. Применяют количественные способы и статистику для определения уровня изменений, наблюдаемых между группами.

Пример 11. Оценивание антител к mis-TTR в модели имплантата Matrigel

[00339] Заявитель определил, что предварительно агрегированный hTTR может быть суспендирован в Matrigel (BD Bioscience, каталожный № 354263), которому дают возможность затвердеть, а затем можно поместить подкожно мышам. Через четыре недели после имплантации имплантат Matrigel сохранил свою структуру, и агрегированный hTTR все еще присутствовал в имплантате. Кроме того, имплантат хорошо переносился мышами, и антитела против hTTR были способны проникать и связываться с агрегатами, суспендированными в Matrigel. Исходя из этих сведений, проводится исследование эффективности антител. Животных усыпляют, и имплантат, содержащий предварительно агрегированный hTTR, суспендированный в Matrigel, подкожно помещают мышам. После соответствующего периода восстановления, мышей делят на три группы лечения (n=10/группа), и обрабатывают еженедельно в течение от двух до четырех недель внутрибрюшинной дозой переносчика, контрольного антитела

(изотипный контроль, 10 мг/кг тела) или антитела против hTRR (10 мг/кг тела). После последней обработки мышей подвергают эвтаназии, кожу, содержащую имплантат, собирают и обрабатывают, а затем количество оставшихся отложений TTR оценивают с помощью гистологических и/или биохимических способов. Используют количественный анализ и статистику для определения уровня клиренса, наблюдаемого между группами.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Протена Биосайенсис Лимитед
Юниверсити Хэлс Нетуорк

<120> АНТИТЕЛА К ТРАНСТИРЕТИНУ

<130> 057450/473380

<150> 62/109,001

<151> 2015-01-28

<150> 62/266,557

<151> 2015-12-11

<160> 63

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 1

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

<210> 2

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 2

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

<210> 5
<211> 118
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

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

<210> 6
<211> 118
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 118
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 7

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

<210> 8

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 8

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

<210> 9

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 9

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

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 10
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 10
 Asn Tyr Tyr Met Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 11
 Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 12
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 12
 Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 13
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 13
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Arg Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50						55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ile	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105					110		

<210> 14

<211> 112

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 14

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

<210> 15

<211> 112

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 15

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	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	Ser
			20					25					30		
Asn	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	Gly
				85					90					95	
Leu	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 16

<211> 112

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 16

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

<210> 17

<211> 112

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 17

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

<210> 18

<211> 16

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 18

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

<210> 19

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 19
Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 20
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
<211> 411
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 21
atgaactttg ggttcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtgt gaagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggtccct gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ttttagtaac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtattgatg gtaataatat ctaccatcca 240
gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agacagtgc 360
tacggctact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca cegtctctc a 411

<210> 22
<211> 137
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 22
Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly
115 120 125
Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

<210> 23
 <211> 393
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 23
 atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60
 gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcatat ctagtcagag cattgtacat agtaatggaa acacctattt agaatggtac 180
 ctgcagaaaac gaggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa acgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcatact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgctttc aagggttcaca tgttccgctc 360
 acgttcggtg gtgggaccaa gctggagctg aaa 393

<210> 24
 <211> 131
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 24
 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 Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Arg
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
 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 Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys
 130

<210> 25
 <211> 330
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

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

Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Val	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	305	310	315
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							325	330	

<210> 26

<211> 330

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 26

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				

130		135		140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp				
145		150		155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu				
		165		170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu				
		180		185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn				
		195		200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				
		210		215
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu				
225		230		235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr				
		245		250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn				
		260		265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe				
		275		280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn				
		290		295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr				
305		310		315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
		325		330

<210> 27

<211> 330

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys				
1		5		10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr				
		20		25
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser				
		35		40
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser				
		50		55
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr				
65		70		75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys				
		85		90
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys				
		100		105
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro				
		115		120
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys				
		130		135
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp				
145		150		155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu				
		165		170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu				
		180		185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn				
		195		200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				
		210		215
				220

Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 28

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 28

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

<210> 29

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 29

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

<210> 30
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

			420					425				430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 31

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 31

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
		20						25					30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35					40						45			
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn	Asn	Ile	Tyr	His	Pro	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120						125		
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145				150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
		180					185						190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210				215						220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245						250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		260						265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280				285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			325						330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400

Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 32

<211> 448

<212> Бeлoк

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 32

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn	Asn	Ile	Tyr	His	Pro	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195				200						205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser

370	Asn Gly Gln Pro Glu	375	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	380	Pro Pro Val Leu Asp
385		390		395	400
Ser Asp Gly Ser Phe	405	Leu Tyr Ser Lys	410	Leu Thr Val Asp	Lys Ser
Arg Trp Gln Gln Gly	420	Asn Val Phe Ser Cys	425	Ser Val Met His	Glu Ala
Leu His Asn His Tyr Thr	435	Gln Lys Ser Leu Ser	440	Leu Ser Pro Gly	Lys
				445	

<210> 33

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val	5	Glu Ser Gly Gly Gly	10	Leu Val Gln Pro Gly Gly	15
Ser Leu Arg Leu Ser	20	Cys Ala Ala Ser Gly	25	Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	30
Tyr Met Ser Trp Val	35	Arg Gln Ala Pro Gly	40	Lys Gly Leu Glu Trp Val	45
Ala Tyr Ile Ser Ile	50	Asp Gly Asn Asn Ile	55	Tyr His Pro Asp Ser Val	60
Lys Gly Arg Phe Thr	65	Ile Ser Arg Asp Asn	70	Ala Lys Ser Thr Leu Tyr	75
Leu Gln Met Ser Ser	85	Leu Arg Ala Glu Asp	90	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	95
Ala Arg Asp Ser Asp	100	Tyr Gly Tyr Phe Asp	105	Val Trp Gly Gln Gly Thr	110
Leu Val Thr Val Ser	115	Ser Ala Ser Thr Lys	120	Gly Pro Ser Val Phe Pro	125
Leu Ala Pro Ser Ser	130	Lys Ser Thr Ser Gly	135	Gly Thr Ala Ala Leu Gly	140
Cys Leu Val Lys Asp	145	Tyr Phe Pro Glu Pro	150	Val Thr Val Ser Trp Asn	155
Ser Gly Ala Leu Thr	165	Ser Gly Val His Thr	170	Phe Pro Ala Val Leu Gln	175
Ser Ser Gly Leu Tyr	180	Ser Leu Ser Ser Val	185	Val Val Thr Val Pro Ser	190
Ser Leu Gly Thr Gln	195	Thr Tyr Ile Cys Asn	200	Val Asn His Lys Pro Ser	205
Asn Thr Lys Val Asp	210	Lys Arg Val Glu Pro	215	Lys Ser Cys Asp Lys Thr	220
His Thr Cys Pro Pro	225	Cys Pro Ala Pro Glu	230	Leu Leu Gly Gly Pro Ser	235
Val Phe Leu Phe Pro	245	Pro Lys Pro Lys Asp	250	Thr Leu Met Ile Ser Arg	255
Thr Pro Glu Val Thr	260	Cys Val Val Val Asp	265	Val Ser His Glu Asp Pro	270
Glu Val Lys Phe Asn	275	Trp Tyr Val Asp Gly	280	Val Glu Val His Asn Ala	285
Lys Thr Lys Pro Arg	290	Glu Glu Gln Tyr Asn	295	Ser Thr Tyr Arg Val Val	300
Ser Val Leu Thr Val	305	Leu His Gln Asp Trp	310	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	315
Lys Cys Lys Val Ser	325	Asn Lys Ala Leu Pro	330	Ala Pro Ile Glu Lys Thr	335
Ile Ser Lys Ala Lys	340	Gly Gln Pro Arg Glu	345	Pro Gln Val Tyr Thr Leu	350

Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395				400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 34

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 34

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
	35					40						45			
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn	Asn	Ile	Tyr	His	Pro	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70						75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
		100						105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
	115					120						125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130				135						140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145				150						155				160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165					170						175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
	180						185						190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195					200						205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210				215						220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235				240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245						250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		260						265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	275					280						285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290				295						300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315				320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr

				325					330				335			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355					360					365				
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		435					440					445				

<210> 35

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 35

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

Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
370						375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405				410						415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 36

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 36

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	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	Ile	Val	His	Ser
			20				25					30			
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35				40					45				
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50					55					60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
			85					90						95	
Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100					105						110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
130						135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155				160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
			165					170						175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
		180					185						190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195				200						205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
		210				215									

<210> 37

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 37

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	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	Ile	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	210					215									

<210> 38

<211> 147

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met	Ala	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ala	Gly	Leu	Val	Phe
1				5					10					15	
Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Pro	Thr	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu
			20					25					30		
Met	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Asn	Val
		35					40					45			
Ala	Val	His	Val	Phe	Arg	Lys	Ala	Ala	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Pro	Phe
	50					55				60					
Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr	Thr
65					70					75					80
Glu	Glu	Glu	Phe	Val	Glu	Gly	Ile	Tyr	Lys	Val	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	
Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu
			100					105					110		
Val	Val	Phe	Thr	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ile	Ala
		115					120					125			
Ala	Leu	Leu	Ser	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn
	130					135					140				
Pro	Lys	Glu													
145															

<210> 39

<211> 127

<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly	Pro	Thr	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Met	Val	Lys	Val
1				5				10						15	
Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Asn	Val	Ala	Val	His	Val
			20					25					30		
Phe	Arg	Lys	Ala	Ala	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys
		35					40					45			
Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe
	50					55					60				
Val	Glu	Gly	Ile	Tyr	Lys	Val	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Ser	Tyr	Trp	Lys
65					70				75						80
Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu	Val	Val	Phe	Thr
				85					90					95	
Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser
			100					105					110		
Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Glu	
		115					120					125			

<210> 40
<211> 127
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly	Pro	Thr	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Met	Val	Lys	Val
1				5				10						15	
Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Asn	Val	Ala	Val	His	Val
			20					25					30		
Phe	Arg	Lys	Ala	Ala	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys
		35					40					45			
Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe
	50					55					60				
Val	Glu	Gly	Ile	Tyr	Lys	Val	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Ser	Tyr	Trp	Lys
65					70				75						80
Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu	Val	Val	Phe	Thr
				85					90					95	
Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser
			100					105					110		
Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Glu	
		115					120					125			

<210> 41
<211> 138
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu
			100					105					110		
Val	Val	Phe	Thr	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Ser
		115					120					125			
Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Glu						
	130					135									

<210> 42
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 42
 Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
 1 5

<210> 43
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 43
 Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Gly Gly Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 44
 Cys Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
 1 5 10

<210> 45
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 45
 Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Cys Gly Gly
 1 5 10

<210> 46
 <211> 990
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 46

```
gcctccacca aggggtccatc ggtctttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
aatcttctgt acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggctag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gaggaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990
```

<210> 47

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 47

```
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc tttccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcttg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321
```

<210> 48

<211> 318

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 48

```
actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaagagac 300
ttcaacaggg gagagtgt 318
```

<210> 49

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 49

Met	Asn	Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	
Val	Lys	Cys													

<210> 50
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 50
 atgaactttg ggttcagctt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtgt gaagtgt 57

<210> 51
 <211> 19
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

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

<210> 52
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 52
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagt 57

<210> 53
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная

<400> 53
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aacgaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaacgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcat actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggttc acatgttccg 300
 ctcacgttcg gtggtgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 54
 <211> 354
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 54

```
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacttttagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatac attagtattg atggtaataa tatctaccat 180
ccagacagtg tgaaggggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaataa gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagacagt 300
gactacggct acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354
```

<210> 55

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 55

```
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgaactcc tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354
```

<210> 56

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 56

```
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgaactcc tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354
```

<210> 57

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 57

```
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgaactcc tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagtc caccctgtac 240
ctgcagatgt cctccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354
```

<210> 58

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 58

```
gaggtgcagc  tgggtggagtc  cggcgggcggc  ctggtgcagc  cggcgggctc  cctgcgcctg  60
tcctgcgccg  cctccggctt  caccttctcc  aactactaca  tgtcctgggt  gcgccaggcc  120
cccggcaagg  gcctggagtg  ggtggcctac  atctccatcg  acggcaacaa  catctaccac  180
cccgactccg  tgaagggccg  cttcaccatc  tcccgcgaca  acgccaagtc  caccctgtac  240
ctgcagatgt  cctccctgcg  cgccgaggac  accgccgtgt  actactgcgc  ccgcgactcc  300
gactacggct  acttcgacgt  gtggggccaa  ggcaccctgg  tgaccgtgtc  ctca          354
```

<210> 59

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 59

```
gaggtgcagc  tgggtggagtc  cggcgggcggc  ctggtgcagc  cggcgggctc  cctgaagctg  60
tcctgcgccg  cctccggctt  caccttctcc  aactactaca  tgtcctgggt  gcgccaaagg  120
cccggcaagg  gcctggagtg  ggtgtcctac  atctccatcg  acggcaacaa  catctaccac  180
cccgactccg  tgaagggccg  cttcaccatc  tcccgcgaca  acgccaagaa  caccctgtac  240
ctgcagatga  actccctgaa  ggccgaggac  accgccatgt  actactgcgc  ccgcgactcc  300
gactacggct  acttcgacgt  gtggggccaa  ggcaccctgg  tgaccgtgtc  ctca          354
```

<210> 60

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 60

```
gaggtgcagc  tgggtggagtc  cggcgggcggc  ctggtgcagc  cggcgggctc  cctgaagctg  60
tcctgcgccg  cctccggctt  caccttctcc  aactactaca  tgtcctgggt  gcgccaaagg  120
cccggcaagg  gcctggagtg  ggtggcctac  atctccatcg  acggcaacaa  catctaccac  180
cccgactccg  tgaagggccg  cttcaccatc  tcccgcgaca  acgccaagaa  caccctgtac  240
ctgcagatga  actccctgaa  ggccgaggac  accgccatgt  actactgcgc  ccgcgactcc  300
gactacggct  acttcgacgt  gtggggccaa  ggcaccctgg  tgaccgtgtc  ctca          354
```

<210> 61

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 61

```
gacgtggtga  tgaccagac  ccccctgtcc  ctgcccgtga  ccccggcgca  gcccgctcc  60
atctcctgcc  gtcctccca  gtccatcgtg  cactccaacg  gcaacacctc  cctggagtgg  120
tacctgcaga  agcccggcca  gtcccccaag  ctgctgatct  acaaggtgtc  caagcgcttc  180
tccggcgtgc  ccgaccgctt  ctccggctcc  ggctccggca  ccgacttcac  cctgaagatc  240
tcccgcgtgg  aggccgagga  cgtgggcgtg  tactactgct  tccagggctc  ccacgtgccc  300
ctgaccttcg  gcggcggcac  caaggtggag  atcaaa          336
```

<210> 62

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 62

```
gacatcgtga tgaccagac cccctgtcc ctgcccgtga ccccggcga gccgcctcc 60
atctcctgcc gtcctccca gtccatcgtg cactccaacg gcaacaccta cctggagtgg 120
tacctgcaga agcccgcca gtccccaag ctgctgatct acaagggtgc caagcgcttc 180
tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgct tccagggtc ccacgtgcc 300
ctgaccttcg gcggcggcac caaggaggag atcaaa 336
```

<210> 63

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 63

```
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser
1           5           10
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с транстиретином, содержащее три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи в основном из антитела 6C1.
2. Антитело по п. 1, содержащее, согласно нумерации по Кабату, три CDR тяжелой цепи (SEQ ID NO: 10-12, соответственно) и три CDR легкой цепи (SEQ ID NO: 18-20 соответственно) антитела 6C1.
3. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что CDR-H1 тяжелой цепи представляет собой составную CDR-H1 по Кабату-Чотиа (SEQ ID NO: 63).
4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно представляет собой моноклональное антитело.
5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно представляет собой химерное, гуманизированное, венированное или человеческое антитело.
6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно имеет изотип IgG1 человека.
7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что оно имеет изотип IgG2 или IgG4 человека.
8. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что оно представляет собой гуманизированное или химерное антитело 6C1, которые специфически связывается с транстиретином, причем 6C1 представляет собой мышинное антитело, характеризующееся вариабельной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и вариабельной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 13.
9. Гуманизированное антитело по п. 8, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 6C1, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 6C1.
10. Гуманизированное антитело по п. 9, отличающееся тем, что вариабельная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Кабату антитела 6C1 (SEQ ID NO: 10-12), а вариабельная область

гуманизированной зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Кабату антитела 6C1 (SEQ ID NO: 18-20).

11. Гуманизированное антитело по любому из пп. 8-10, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 17.

12. Гуманизированное антитело по п. 9, отличающееся тем, что в позиции H77 находится T.

13. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что в позиции H49 находится A.

14. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что в позициях H76 и H82(a) находится S.

15. Гуманизированное антитело по п. 14, отличающееся тем, что в позиции H49 находится A.

16. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что в позициях H19, H44, H83, и H89 находятся соответственно K, R, K, и M.

17. Гуманизированное антитело по п. 16, отличающееся тем, что в позиции H49 находится A.

18. Гуманизированное антитело по п. 9, отличающееся тем, что в позиции L45 находится K.

19. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что в позиции L2 находится V.

20. Гуманизированное антитело по любому из пп. 12-17, отличающееся тем, что в позиции L45 находится K.

21. Гуманизированное антитело по п. 20, отличающееся тем, что в позиции L2 находится V.

22. Гуманизированное антитело по п. 11, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 17.

23. Гуманизированное антитело по п. 22, отличающееся тем, что оно содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 17.

24. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

25. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

26. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

27. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

28. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

29. Гуманизированное антитело по п. 12, отличающееся тем, что вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

30. Гуманизированное антитело по любому из пп. 24-29, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

31. Гуманизированное антитело по любому из пп. 24-29, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

32. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

33. Гуманизированное антитело по п. 18, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

34. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

35. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

36. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

37. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

38. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

39. Гуманизированное антитело по п. 32 или 33, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

40. Гуманизированное антитело по п. 24, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

41. Гуманизированное антитело по п. 24, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

42. Гуманизированное антитело по п. 25, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

43. Гуманизированное антитело по п. 25, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

44. Гуманизированное антитело по п. 26, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

45. Гуманизированное антитело по п. 26, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

46. Гуманизированное антитело по п. 27, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

47. Гуманизированное антитело по п. 27, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

48. Гуманизированное антитело по п. 28, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

49. Гуманизированное антитело по п. 28, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

50. Гуманизированное антитело по п. 29, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

51. Гуманизированное антитело по п. 29, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

52. Антитело по любому из пп. 1-51, отличающееся тем, что представляет собой интактное антитело.

53. Антитело по любому из пп. 1-51, отличающееся тем, что представляет собой связывающий фрагмент.

54. Антитело по п. 53, отличающееся тем, что связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или Fab'2-фрагмент.

55. Гуманизированное антитело по любому из пп. 8-52, отличающееся тем, что переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, а переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

56. Гуманизированное антитело по п. 55, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму естественной константной области тяжелой цепи человека, которая имеет ослабленное связывание с рецептором Fc γ относительно естественной константной области тяжелой цепи человека.

57. Гуманизированное антитело по п. 55 или 56, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи является таковой изотипа IgG1.

58. Гуманизированное антитело по п. 55, отличающееся тем, что переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 26, и/или переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 28.

59. Гуманизированное антитело по любому из пп. 8-58, отличающееся тем, что любые различия в CDR переменной области зрелой тяжелой цепи и переменной области зрелой легкой цепи из SEQ ID NO: 1 и 13, соответственно, находятся в позициях H60-H65.

60. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

61. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела как описано в любом из пп. 1-59.

62. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 61.

63. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии по п. 62.

64. Способ гуманизации антитела, включающий:

а) выбор акцепторного антитела;

б) идентификацию аминокислотных остатков мышинового антитела, подлежащих сохранению;

в) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и

г) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для продуцирования гуманизованного антитела;

причем антитело мыши содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

65. Способ продуцирования гуманизированного, химерного или венированного антитела, включающий:

а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, так что клетки секретируют антитело; и

б) очистку антитела от клеточной культуральной среды;

причем антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 6C1.

66. Способ создания клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело, включающий:

а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела и маркер селекции в клетки;

б) размножение клеток в условиях, позволяющих отбирать клетки, имеющие увеличенное количество копий вектора;

в) выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и

б) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода антитела;

причем антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 6C1.

67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что он дополнительно включает размножение клеток в селективных условиях и скрининг для обнаружения линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

68. Способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом или или риском его развития,

включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

69. Способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая накопление транстиретина у субъекта.

70. Способ уменьшения количества отложений транстиретина у субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой, тем самым уменьшая количество отложений транстиретина у субъекта.

71. Способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой, тем самым устраняя агрегаты транстиретина у субъекта по сравнению с субъектом, имеющим транстиретин-опосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела.

72. Способ стабилизации нетоксичной формы транстиретина у субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой, тем самым стабилизируя нетоксичную форму транстиретина у субъекта.

73. Способ лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой.

74. Способ замедления начала проявления транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59 эффективной схемой.

75. Способ диагностирования транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта с эффективным количеством антитела по любому из пп. 1-59.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что он дополнительно включает обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем присутствие связанного антитела указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

77. Способ по п. 75 или 76, отличающийся тем, что он дополнительно включает сравнение связывания антитела с биологическим образцом со связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки того же самого тканевого происхождения.

79. Способ по любому из пп. 75-78, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань.

80. Способ по п. 79, отличающийся тем, что твердая ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

81. Способ по любому из пп. 68-80, отличающийся тем, что транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой семейный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз.

82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что семейный транстиретиновый амилоидоз представляет собой семейную амилоидную кардиомиопатию (FAC), семейную амилоидную полинейропатию (FAP) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA).

83. Способ по п. 81, отличающийся тем, что спорадический транстиретиновый амилоидоз представляет собой старческий системный амилоидоз (SSA) или старческий сердечный амилоидоз (SCA).

84. Способ по любому из пп. 68-80, отличающийся тем, что транстиретин-опосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах или желудочно-кишечном тракте субъекта.

85. Способ выявления присутствия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта, подозреваемого в наличии амилоидного накопления, с эффективным количеством антитела по любому из пп. 1-59.

86. Способ по п. 85, отличающееся тем, что он дополнительно включает обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстиретина.

87. Способ по п. 85 или 86, отличающееся тем, что он дополнительно включает сравнение связывания антитела с биологическим образцом со связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки того же самого тканевого происхождения.

89. Способ по любому из пп. 85-87, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что твердая ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

91. Способ определения количества отложений транстиретина у субъекта, включающий введение антитела по любому из пп. 1-59 и обнаружение присутствия связанного антитела у субъекта.

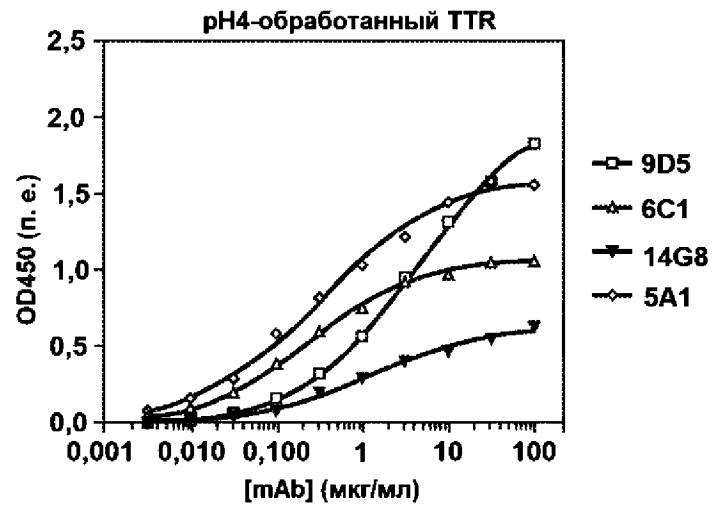
92. Способ по п. 91, отличающийся тем, что присутствие связанного антитела определяется с помощью позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ).

		10	20	30	40	
m5A1VH	EVKLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFS	NYAMSWVRQTPE				42
3LS4_H_St.pro	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFN	NYVMVWLRQTPE				42
AGP01680	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSS	SNYMSWVRQAPG				42
Hu5A1VHv1	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYAMSWVRQAPG				42
Hu5A1VHv2	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYAMSWVRQAPG				42
		50	60	70	80	
m5A1VH	KRLEWVASISSGGSTYYPD	SVKGRFTISRDNARNILYLQMS				84
3LS4_H_St.pro	KRLEWVASISRGGSTYYPD	SVKGRFTISRDNARNILYLQMS				84
AGP01680	KGLEWVSVIYSGGSTYYAD	SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS				84
Hu5A1VHv1	KGLEWVSSISSGGSTYYPD	SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS				84
Hu5A1VHv2	KGLEWVSSISSGGSTYYPD	SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS				84
		90	100	110		
m5A1VH	LRSED	TAMYYCVRYYYGQYFDFWGQGTALT				VSS 117 (SEQ ID NO:1)
3LS4_H_St.pro	LRSED	TAMYYCVRGTTIVAGDVWGAGTTVT				VSS 117 (SEQ ID NO:2)
AGP01680	LRAED	TAVYYCARSVVQGPFLDWGQGT				LT
Hu5A1VHv1	LRAED	TAVYYCVRYYYGQYFDFWGQGT				LT
Hu5A1VHv2	LRAED	TAVYYCARYYYGQYFDFWGQGT				LT

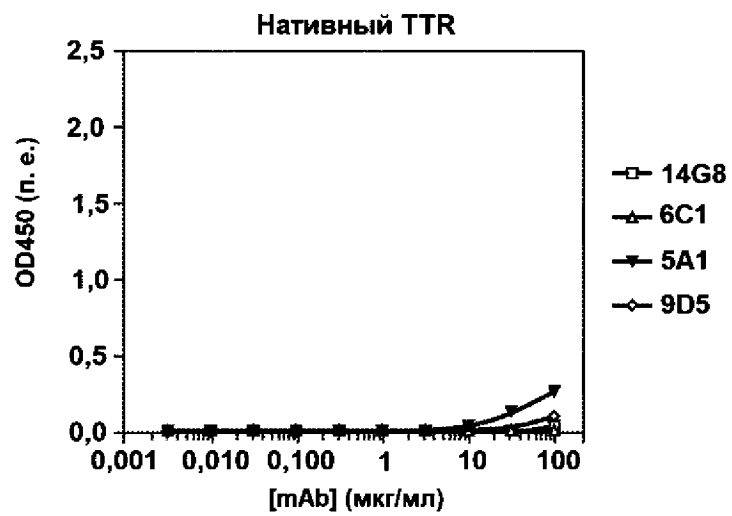
Фиг. 1

		10	20	30	40	
m5A1VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTTVAWYRQKP	40				
3IU4_L_St.pro	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKP	40				
BAH04766	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYSNWWYQQKP	40				
Hu5A1VLv1	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTTVAWYQQKP	40				
Hu5A1VLv2	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTTVAWYQQKP	40				
		50	60	70	80	
m5A1VL	GQSPELLIYSASYRCTGVDPDRFTGSGSGADFTFTISSVQA	80				
3IU4_L_St.pro	GQSPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFFTFTISSVQA	80				
BAH04766	GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	80				
Hu5A1VLv1	GKAPKLLIYSASYRCTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	80				
Hu5A1VLv2	GKAPKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	80				
		90	100			
m5A1VL	EDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK	107	(SEQ ID NO:9)			
3IU4_L_St.pro	EDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLELK	107	(SEQ ID NO:10)			
BAH04766	EDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:11)			
Hu5A1VLv1	EDFAVYYCQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:12)			
Hu5A1VLv2	EDFAVYYCQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	107	(SEQ ID NO:13)			

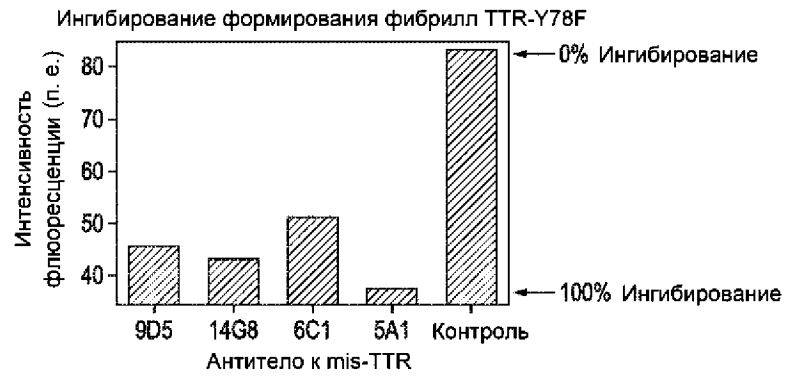
Фиг. 2



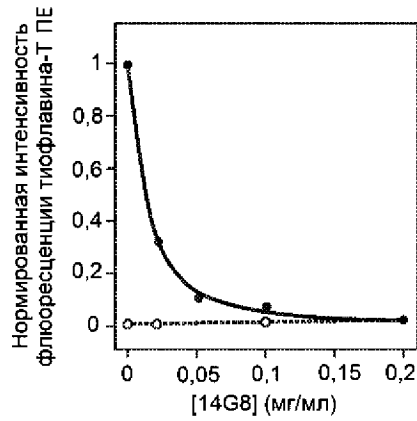
Фиг. 3А



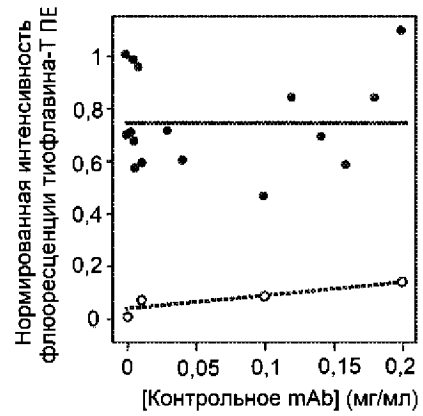
Фиг. 3В



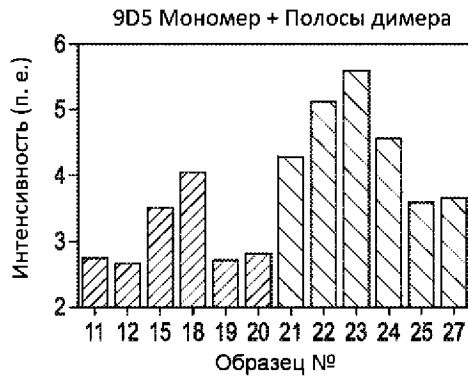
Фиг. 4А



Фиг. 4В



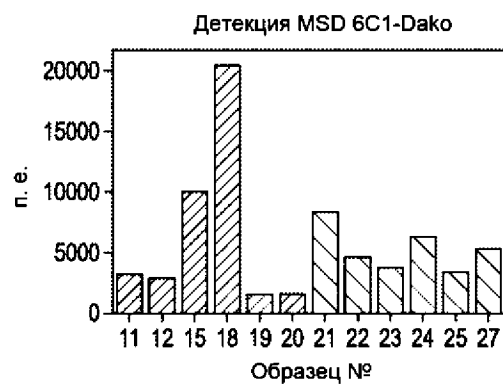
Фиг. 4С



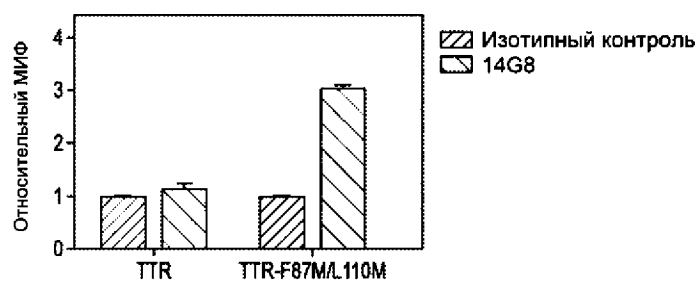
Фиг. 5А



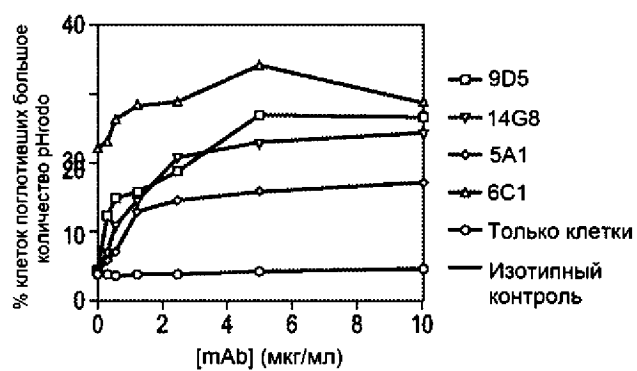
Фиг. 5В



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В