

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036048**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.18**

**(21)** Номер заявки  
**201791711**

**(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**

**(43)** **2017.11.30**

**(86)** **PCT/IB2016/050414**

**(87)** **WO 2016/120809 2016.08.04**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС  
ЛИМИТЕД (IE); ЮНИВЕРСИТИ  
ХЭЛС НЕТУОРК (CA)**

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

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.  
(RU)**

**(56)** US-A1-2014056904  
WO-A1-2010030203  
WO-A2-2014124334  
MONICHAN PHAY ET AL.: "Transthyretin  
Aggregate-Specific Antibodies Recognize Cryptic  
Epitopes on Patient-Derived Amyloid Fibrils",  
REJUVENATION RESEARCH, vol. 17, no. 2, 1 April  
2014 (2014-04-01), pages 97-104, XP055256411,  
US ISSN: 1549-1684, DOI: 10.1089/rej.2013.1524  
abstract

Olivier Léger ET AL.: "Antibody Drug  
Discovery Chapter 1: "Humanization of Antibodies"  
In: "Molecular Medicine and Medicinal Chemistry",  
1 January 2011 (2011-01-01), XP055119233, pages  
1-23, the whole document

---

**(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.

---

**B1**

**036048**

**036048 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственную заявку**

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

### **Ссылка на перечень последовательностей**

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

### **Уровень техники**

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.

Транстиретин (TTR) является одним из многих белков, которые, как известно, могут неправильно свертываться и агрегировать (например, подвергаются амилоидогенезу). Связанный с транстиретином амилоидоз включает две формы заболевания: наследственное 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**

В одном аспекте изобретение относится к антителам, которые специфически связывают транстиретин, содержащий три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, по существу, 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, венеризированные или человеческие антитела. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG1 человека. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG2 или IgG4 человека.

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.

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).

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 T. В некоторых таких антителах позиция H49 занята A. В некоторых таких антителах позиция H76 и H82(a) заняты S. В некоторых таких антителах позиция H49 занята A. В некоторых таких антителах позиции H19, H44, H83 и H89 заняты соответственно K, R, K и M. В некоторых таких антителах позиция H49 занята A. В некоторых таких антителах позиция L45 занята K. В некоторых таких антителах позиция L2 занята V.

Некоторые антитела содержат вариательную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариательную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 17. Некоторые антитела содержат вариательную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариательную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную SEQ ID NO: 17.

В некоторых таких антителах вариательная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых таких антителах вариательная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых таких антителах вариательная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых таких антителах вариательная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых таких антителах вариательная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых таких антителах вариательная область

зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

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.

В некоторых таких антителах переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 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: 4, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 $\gamma$  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.

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.

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

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.

В другом аспекте изобретение относится к способу гуманизации антитела, включающему:

- 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 анти-

тела;

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.

В другом аспекте изобретение относится к способу изготовления гуманизованного, химерного или венероанного антитела, включающему:

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

б) очистку антитела от клеточной культуральной среды;

причем антитело представляет собой гуманизованную, химерную или венероанную форму 6С1.

В другом аспекте изобретение относится к способу изготовления клеточной линии, продуцирующей гуманизованное, химерное или венероанное 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 гуманизованную, химерную или венероанную форму 6С1.

Некоторые такие способы дополнительно включают размножение клеток в селективных условиях и отбор линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10<sup>6</sup> клеток/24 ч.

В другом аспекте в изобретении предложен способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретиноопосредованный 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.

В другом аспекте в изобретении предложен способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта, имеющего транстиретиноопосредованный 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.

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

В другом аспекте в изобретении предложен способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретиноопосредованный 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 транстиретиноопосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела.

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

В другом аспекте в изобретении предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретиноопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

В другом аспекте в изобретении предложен способ замедления начала проявления транстиретиноопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

В другом аспекте в изобретении предложен способ диагностирования транстиретиноопосредованного 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 транстиретиноопосредованный 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 транстиретиноопосредованный амилоидоз.

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

В некоторых способах транстретиноспосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстретиновый амилоидоз или спорадический транстретиновый амилоидоз. В некоторых таких способах наследственный транстретиновый амилоидоз является наследственной амилоидной кардиомиопатией (FAC), наследственной амилоидной полинейропатией (FAP) или селективным амилоидозом центральной нервной системы (CNSA). В некоторых таких способах спорадический транстретиновый амилоидоз является старческим системным амилоидозом (SSA) или старческим сердечным амилоидозом (SCA).

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

В другом аспекте в изобретении предложен способ выявления присутствия или отсутствия отложенных транстретина 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 транстретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстретина. 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 транстретиноспосредованный амилоидоз. В некоторых таких способах биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения. В некоторых таких способах биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань. В некоторых таких способах плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

В другом аспекте в изобретении предложен способ выявления количества отложений транстретина 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**

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.

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.

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.

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.

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. 5В иллюстрирует анализ оптической плотности Вестерн-блот анализа тех же образцов с применением антитела 5A1 mis-TTR.

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.

Фиг. 7А и 7В: фиг. 7А иллюстрирует эффект антитела 14G8 на поглощение TTR с F87M/L110M клетками THP-1; фиг. 7В иллюстрирует эффект каждого антитела к mis-TTR на поглощение TTR с V30M клетками THP-1.

#### **Краткое описание последовательностей**

SEQ ID NO: 1 указана как аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 6C1 мыши.

SEQ ID NO: 2 указана как аминокислотная последовательность шаблона структуры переменной области тяжелой цепи мыши.

SEQ ID NO: 3 указана как аминокислотная последовательность переменной области акцептора тяжелой цепи с идентификационным номером ADX65650.

SEQ ID NO: 4 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 1 гуманизованного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1).

SEQ ID NO: 5 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 1b гуманизованного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1b).

SEQ ID NO: 6 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 2 гуманизованного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2).

SEQ ID NO: 7 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 2b гуманизованного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2b).

SEQ ID NO: 8 указана как аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи варианта 3 гуманизованного антитела 6C1 (Hu6C1VHv3).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 28 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области легкой цепи с N-концевым аргинином.

SEQ ID NO: 29 указана как аминокислотная последовательность типичной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина.

SEQ ID NO: 30 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 1 гуманизованного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 31 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 1b гуманизованного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 32 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 2 гуманизованного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 33 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 2b гуманизованного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 34 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 3 гуманизованного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 35 указана как аминокислотная последовательность области тяжелой цепи варианта 3b гуманизированного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 36 указана как аминокислотная последовательность области легкой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 37 указана как аминокислотная последовательность области легкой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1.

SEQ ID NO: 38 указана как аминокислотная последовательность транстриретина человека, представленная под идентификационным номером P02766.1 (UniProt).

SEQ ID NO: 39 указана как аминокислотная последовательность транстриретина человека, представленная под идентификационным номером AAB35639.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 40 указана как аминокислотная последовательность транстриретина человека, представленная под идентификационным номером AAB35640.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 41 указана как аминокислотная последовательность транстриретина человека, представленная под идентификационным номером ABI63351.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 42 указана как аминокислотная последовательность остатков 89-97 транстриретина человека.

SEQ ID NO: 43 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстриретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 44 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстриретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 45 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстриретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 46 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область тяжелой цепи IgG1 G1m3.

SEQ ID NO: 47 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область легкой цепи с N-концевым аргинином.

SEQ ID NO: 48 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая типичную константную область легкой цепи без N-концевого аргинина.

SEQ ID NO: 49 указана как аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области тяжелой цепи.

SEQ ID NO: 50 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области тяжелой цепи.

SEQ ID NO: 51 указана как аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области легкой цепи.

SEQ ID NO: 52 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области легкой цепи.

SEQ ID NO: 53 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи 6C1 мыши.

SEQ ID NO: 54 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи 6C1 мыши.

SEQ ID NO: 55 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 1 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1).

SEQ ID NO: 56 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 1b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv1b).

SEQ ID NO: 57 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 2 гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2).

SEQ ID NO: 58 указана как нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи варианта 2b гуманизированного антитела 6C1 (Hu6C1VHv2b).

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

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

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

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

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

Определения.

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.

Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном означает аффинность, составляющую 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.

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) цепь и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит варибельную область длиной примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в основном отвечающих за распознавание антигена. Данная варибельная область в первоначальном экспрессированном виде связана с отщепляемым сигнальным пептидом. Варибельная область без сигнального пептида иногда упоминается как зрелая варибельная область. Так, например, зрелая варибельная область легкой цепи обозначает варибельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом отвечающую за эффекторную функцию.

Легкие цепи делят на каппа и лямбда. Тяжелые цепи разделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эписилон, и выделяют такие изоформы антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей варибельная и константная области соединяются областью "J", длиной около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область "D", включающую около 10 или более аминокислот (см. 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)).

Варибельная область легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (также называемая в данном документе "варибельный домен легкой цепи" ("домен VL") или "варибельный 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.

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. Biol.* 196: 901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342: 878-883, 1989); совмещенное определение для CDR по Чотиа-Кабату, в котором CDR-H1 являются 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. табл. 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 определениям 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.

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')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, 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 гуманизованное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (см., например, Songvilai 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 гуманизованного 6C1 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстирине, чем тот, что связан антителом 6C1.

В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизованное 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 инсулинподобного 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 рецепторопосредованного транцитоза. 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, 84-43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84-44, 2011).

Примерами биспецифических антител также могут быть 1) антитело с двойным переменным доменом (DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме посредством короткого пептидного соединения (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) 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 мультиспецифической 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, присоединенных 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).

Термин "эпитоп" относится к сайту на антиген, 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 извест-

ные 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 (см., 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.

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.

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 2×, 5×, 10×, 20× или 100×) 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.

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.

Термин "неправильно свернутый" по отношению к TTR относится к вторичной и третичной структурам 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.

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.

Термин "пациент" включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

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.

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 фильтраций, дистилляций, экстракций, концентрированных, фиксаций, инактиваций мешающих компонентов и тому подобного.

Термин "контрольный образец" относится к биологическому образцу, для которого не известно или не подозревается содержание мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фебрильных 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).

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.

Термин "симптом" относится к субъективным свидетельствам заболевания, таким как измененная походка, как это воспринимается субъектом. "Признак" относится к объективным свидетельствам болезни наблюдаемых врачом.

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.

Идентичность последовательности в процентах определяется с помощью последовательностей антител, максимально выравненных согласно соглашению нумерации Кабата. После выравнивания, если область антитела субъекта (например, вся зрелая варибельная 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.

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.

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

Если иное не вытекает из контекста, термин "около" охватывает значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, SEM) указанного значения.

Статистическая значимость означает  $p \leq 0,05$ .

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.**

В изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с остатками 89-97 транстиретина (TTR). Антитела обладают способностью связываться с мономерными неправильно свернутыми агрегированными или фебрильными 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.**

Транстиретин (TTR) представляет собой сывороточный белок и транспортный белок спинномозговой жидкости, имеет длину 127 аминокислот, массу 55 кДа и синтезируется в основном печени. Он

также упоминается как преальбумин, тироксинсвязывающий преальбумин, ATTR (TTR amyloidosis) и ТВРА (thyroxine-binding prealbumin - тироксинсвязывающий 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.

Установленная функция TTR в крови заключается в транспорте холо-ретинолсвязывающего белка. Хотя TTR является основным переносчиком тироксина (Т<sub>4</sub>) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам, используемым для холо-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания Т<sub>4</sub> фактически незаняты у людей.

TTR является одним по меньшей мере из 13 различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразии 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.

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 AB163351.1 (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. Транстиретинный амилоидоз.

Транстиретинный (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 (см., например, Almeida and Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013)).

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.

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 наследственную амилоидную полиневропатию (FAP - familial amyloid polyneuropathy), наследственную 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).

В гене, кодирующем TTR, более 100 мутаций, которые связывают с аутосомно-доминантными расстройствами FAP и FAC (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)). 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.

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.

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 атриовентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты (см. 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.

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 наследственных 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.

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 фебрильных формах TTR.

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 фебрильной 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.

Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом что и антитело, обозначенное как 6C1. Последовательности зрелых переменных 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 переменные области антитела мыши 6C1 (IgG1, каппа). Фрагменты TTR, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать гуморальный ответ на фрагмент, и/или смешаны с адьювантом, 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 ее 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.

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 варибельную область или тяжелой, или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве исходного материала выбрана варибельная область легкой цепи, то создают библиотеку фагов, в которой элементы отображают одну и ту же варибельную область легкой цепи (то есть исходный материал мыши) и другую варибельную область тяжелой цепи. Варибельные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки перегруппированных варибельных областей тяжелой цепи человека. Отбирается фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание (например, по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , а предпочтительно по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ) для мономера TTR или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97). Варибельная 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 варибельную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплей-библиотеки), и другую варибельную область легкой цепи. Варибельные области легкой цепи могут быть получены, например, из библиотеки перегруппированных варибельных 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 мыши.

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 варибельных 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.

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 варибельную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из варибельной области тяжелой цепи антитела 6C1, и/или варибельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из варибельной 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 варибельных 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.

Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фебрильными 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.

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.

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 (см. Nalrow & 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 адьювантом. Могут быть использованы несколько типов адьювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адьювант Фрейнда, после которого применяют неполный адьювант. 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.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически модифицированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого "донорного" антитела переносят в последовательности "акцепторного" антитела человека (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205 и Foote, US 688157). 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 варибельной 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 варибельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса варибельной 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 варибельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса варибельной 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 варибельной области цепи антитела или константной области цепи антитела являются почти полностью из каркасной последовательности варибельной 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.

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).

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 гиперварибельных 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 конкури-

рующих предпочтений. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мышцы в гуманизованном 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.

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 вариабельной области последовательности акцептора человека и соответствующими каркасами вариабельной области цепи донорного антитела.

Примером последовательности акцептора для тяжелой цепи является вариабельная 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 6С1 мышцы. Примером акцепторной последовательности для легкой цепи является вариабельная 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 6С1 мышцы.

Могут быть выбраны определенные аминокислоты из остатков в каркасе вариабельной 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.

Например, когда аминокислота различается между каркасным остатком вариабельной области мышцы и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, аминокислота в человеческом каркасе может быть замещена эквивалентной каркасной аминокислотой из мышечного 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 Чогна, 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.

Аминокислотные остатки каркаса из классов 1)-3), как определено Queen, US 5530101, иногда по-очередно 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 подгонке антитела к антигену, иногда упоминаются как верниальные остатки (vernier residues) (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

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 мышцы или из эквивалентных позиций более типичных человеческих иммуноглобулинов.

Иллюстративные гуманизованные антитела представляют собой гуманизованные формы антитела 6С1 мышцы, обозначенного Hu6C1. Антитело мышцы содержит вариабельные 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 вариабельных областей гуманизованной 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 вариабельные области зрелой легкой цепи человека: Hu6C1VLv1 (SEQ ID NO: 16) и Hu6C1VLv2 (SEQ ID NOS: 17). Фиг. 1 и 2 иллюстрируют выравнивания вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 6С1, модельных антител мышцы, акцепторных антител человека и гуманизованных вариантов антитела 6С1 соответственно.

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 постраницационной модификации, является необычным остатком для своей позиции в последовательности вариабельной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию, и другим причинам, сле-

дующие десять позиций в каркасе варибельной области были рассмотрены как кандидаты на замещения в шести иллюстративных варибельных областях зрелой легкой цепи человека и в двух иллюстративных варибельных областях зрелой тяжелой цепи человека, как указано далее в примерах: L2, L45, H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83 и H89.

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток представляет собой остаток гуманизованного 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 варибельной области первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR первый упомянутый остаток является мышинным.

Иллюстративные антитела включают любые перестановки или комбинации иллюстративных варибельных 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).

В изобретении предложены варианты гуманизованных антител, в которых варибельная область гуманизованной зрелой тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 4-9, а варибельная область гуманизованной 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.

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 K, R, T, K и M, как в Hu6C1VHv3. В некоторых антителах позиции H19, H44, H49, H77, H83 и H89 в области  $V_H$  заняты соответственно K, R, A, T, K и M, как в Hu6C1VHv3b. В некоторых антителах позиция L45 в области  $V_L$  занята K. 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 K соответственно, как в Hu6C1VLv1. В некоторых антителах одна или обе позиции L2 и L45 в области  $V_L$  заняты I и K соответственно, как в Hu6C1VLv2. Области CDR таких гуманизованных антител могут быть идентичными или почти полностью идентичными областям CDR мышинного 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.

Каркасные позиции варибельных 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.

Возможность для дополнительных изменений в гуманизованных вариантах 6C1 - это дополнительные обратные мутации в каркасах варибельной области. Многие из остатков каркаса, не контактирующих с CDR в гуманизованном 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 варибельной 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.

Предпочтительно замены или обратные мутации в вариантах Hu6C1 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизованного mAb, то есть его способность связываться с мономерным TTR (например, активность в некоторых или всех анализах, описанных в настоящих примерах, варианта гуманизованного антитела 6C1 является, по существу, такой же, то есть в пределах экспериментальной погрешности, как и у антитела 6C1 мыши).

D. Химерные и венерованные антитела.

В изобретении дополнительно предложены химерные и венерованные формы нечеловеческих антител, в частности антител 6C1 примеров.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые вариабельные 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.

Венированное антитело является типом гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и, как правило, все CDR, и некоторые остатки каркаса нечеловеческой вариабельной области нечеловеческого антитела, но в котором заменяют другие каркасные остатки вариабельной 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 вариабельной области нечеловеческого антитела делают более подобными таковым человека с помощью замен. Венированные формы антитела 6С1 включены в изобретение.

#### Е. Антитела человека.

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, чтобы получить антитело с такой специфичностью к эпитопу, как и в конкретном антителе мыши, таком как одно из моноклональных антител мыши, описанных 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.

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 Kucheralapati, WO 91/10741 (1991)) и способы фагового дисплея (см., например, 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).

#### Ф. Выбор константной области.

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, изоформы IgG1 и IgG3 человека могут вызывать зависимость от комплемента цитотоксичность, а изоформы 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.

Одна или несколько аминокислот на amino- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепей, такая как С-концевой лизин тяжелой цепи, может отсутствовать, или может образовать производное в пропорции, или быть во всех молекулах. Замены могут быть сделаны в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплементопосредованная 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 (см., например, 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 изоформом является IgG2 или IgG4 человека.

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 С-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')<sub>2</sub> и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

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

#### G. Экспрессия рекомбинантных антител.

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 V<sub>H</sub> тяжелой цепи клонируют с помощью RT-PCR с использованием мРНК, полученной из клеток гибридомы. Консенсусные праймеры применяют к лидерному пептиду V<sub>H</sub>-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 V<sub>H</sub> также может быть определена или подтверждена путем секвенирования фрагмента V<sub>H</sub>, полученного с помощью 5'-RACE RT-PCR-методики и 3'-g2b-специфического праймера.

Аналогичным образом можно клонировать переменную область V<sub>L</sub> легкой цепи. В одном подходе набор консенсусных праймеров предназначен для амплификации областей V<sub>L</sub>, используя 5'-праймер, предназначенный для гибридизации с областью V<sub>L</sub>, включающей кодон инициации трансляции, и 3'-праймер, специфический к области C<sub>k</sub> ниже от V-J объединяющей области. Во втором подходе используется 5'RACE RT-PCR методика для клонирования кодирующей кДНК V<sub>L</sub>. 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.

В одном из подходов переменные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для того, чтобы они кодировали соединенные донорные последовательности после соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор для экспрессии в клетках млекопитающего, такой как pCMV-hy1 для тяжелой цепи и pCMV-Mc1 для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области  $\gamma$ 1 и C<sub>k</sub> человека как экзонные фрагменты после вставленной кассеты с переменной областью. После проверки последовательности векторы экспрессии с тяжелой цепью и легкой цепью могут быть совместно трансфицированы в клетки CHO для того, чтобы продуцировать химерные антитела. Среду, частично использованную клетками, собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют Вестерн-блот-анализом на продуцирование антител или ELISA на связывание антигена. Химерные антитела гуманизированы, как описано выше.

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 перекрестно-реактивных антител.

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.

*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.

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 (см. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992)).

Альтернативно, последовательности, кодирующие антитела, могут быть внесены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, патенты США №№ 5741957, 5304489 и 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.

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 полибрана, 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 извлеченные от ядра ооциты.

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. Топродуцирующие пулы клеток затем могут быть подвергнуты поклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Могут использоваться специфические урожайности выше 50 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 *Viacore*. Выбранный клон затем может быть перенесен в несколько флаконов и сохранен в замороженном виде для последующего использования.

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)).

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 CHO или улучшение титров белка (см., например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, WO 2004/050884, WO 2008/012142, WO 2008/012142, WO 2005/019442, WO 2008/107388, WO 2009/027471 и US 5888809).

Н. Скрининговые исследования антитела.

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 подвергаться 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 фебрильной формах TTR. Антитела также могут быть подвергнуты скринингу на способность связывать префибриллярные, 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 вариабельные области 6С1 или каппа-изотипа IgG1. Необязательно, в таком анализе иммобилизуют или антитело, или TTR-мишень.

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 фебрильной форм TTR (например, путем Вестерн-блоттинга или путем иммунопреципитации клеточных экстрактов или супернатантов) или на сниженную токсичность, приписываемую мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной 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.

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 мин перед проведением измерений. Флуоресценцию тиофлавина-Т можно наблюдать с помощью спектрофлуориметра (см. US 2014/0056904).

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), наследственная амилоидная полинейропатия (FAP - familial amyloid polyneuropathy), наследственная 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 нулевую мутацию в эндогенном локусе *Ttr* мыши и человеческий мутантный ген TTR, содержащий мутацию V30M, которая связана с наследственной амилоидной полинейропатией (см., 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 наследственных 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).

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

#### I. Нуклеиновые кислоты.

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 ПНР 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 раздельными, например каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

#### Ж. Конъюгированные антитела.

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 (см. WO 03/057838; US 8455622).

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 присоединенные 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.

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 (см., например, Almeida и 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 и 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, ALN-TTR02, ISIS-TTRRx, доксициклином (доху), таурурсодезоксихолевой кислотой (TUDCA), Доху-TUDCA, галлатом эпигаллокатехина (EGCG), куркумином или ресвератролом (3,5,4'-тригидроксистерильбенном). 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.

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 фэйномеры с оптимальными свойствами. Примеры фэйномеров 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., *Ada. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6): 1124-1137 (2013) и Brack et al., *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

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.

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 гуманизованному 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 иттрий<sup>90</sup> (<sup>90</sup>Y), радиосеребро-111, радиосеребро-199, висмут<sup>213</sup>, йод (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), углерод (<sup>14</sup>C), сера (<sup>35</sup>S), тритий (<sup>3</sup>H), индий (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), технеций (<sup>99</sup>Tc), таллий (<sup>201</sup>Tl), галлий (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), палладий (<sup>103</sup>Pd), молибден (<sup>99</sup>Mo), ксенон (<sup>133</sup>Xe), фтор (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn, и <sup>117</sup>Tm; позитронизлучающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов и молекулы, которые радиоактивно мечены или конъюгированы с определенными радиоизотопами.

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 (см. 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 <sup>111</sup>In и <sup>90</sup>Y, можно использовать ибритумомаб тиуксетан, и оно будет реагировать с такими изотопами с образованием <sup>111</sup>In-ибритумомаб-тиуксетана и <sup>90</sup>Y-ибритумомаб-тиуксетана соответственно (см. Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 48 Suppl 1:S91-S95 (2001)).

Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы прямо или косвенно через посредник (например, линкер), с мышным, химерным, венированным или гуманизованным антителом 6C1, применяя методы, известные в данной области техники (см., 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.

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.

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.

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.

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.

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 наследственные амилоидозы TTR, такие как наследственная амилоидная кардиомиопатия (FAC), наследственная 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 продвинутой стадии амилоидоза TTR.

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 и Saraiva, J. Struct. Biol. 130:290-299; Dwulet and Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:657-662 (1983)).

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 атриовентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты (см. 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 наследственных форм заболеваний, необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем TTR, до

постановки окончательного диагноза.

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 (см. 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.

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.

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.

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 фаза III исследования) или у животной модели на уровне  $p < 0,05$ , или 0,01, или даже 0,001.

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.

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.

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.

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.

Антитела могут вводиться через периферический путь. Пути введения включают местный, внутри-

венный, оральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепной, 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 внутричерепной инъекции.

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.

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.

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. Количество 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.

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), амилоидвизуализирующий пептид p31 (биораспределение амилоидвизуализирующего 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 платковым 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.

#### А. Способы диагностики и мониторинга.

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 фебрильными 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.

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.

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 фебрильных 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.

Биологические образцы, полученные от субъекта, подозреваемого в наличии или находящегося 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 фебрильную формы TTR относительно нормальных тетрамерных форм TTR.

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.

Диагностические реагенты могут быть введены в организм субъекта путем внутривенной инъекции 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 меченый 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).

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.

В изобретении дополнительно предложены наборы (например, контейнеры), содержащие гуманизированные антитела bC1, 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 субъединичных доз.

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.

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.

#### Х. Другие применения.

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

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 схемой 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 осталось 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.

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.

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%). Анализ для обнаружения образования фибрилл описаны в другом месте в данном документе. (см. также US 2014/0056904).

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 означают 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.

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 (EHAEEVFTA) (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.

Был синтезирован пептид, содержащий эту последовательность (ggEHAEEVFTAaggkg) (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 присоединен к полилизиновому разветвленному ядру, образуя многосоставной антигенный пептидный иммуноген (TTR-MAP), содержащий ядро из лизиновых остатков с несколькими ответвлениями, присоединенное к пептиду 89-97 TTR. Антитела, перечисленные в табл. 2, были получены против TTR-MAP.

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-cggEHAEEVFTA-амид (SEQ ID NO: 44) и Ac-EHAEEVFTAagg-амид (SEQ ID NO: 45) через N- и C-концевые цистеиновые остатки к гемоцианину фиссуреллы (TTR89-97-N-KLH и TTR89-97-C-KLH).

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 табл. 2. Антимишиный IgG (GE Healthcare) был иммобилизован на сенсорном чипе C5 (без цепей декстрана) через аминное соединение в соответствии с инструкциями, представленными в антимишином 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% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратных разведениях. Для каждой концентрации реакция протекала в течение времени, позволяющего 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  $K_D$ .

Результаты анализа SPR "лидирующих" mis-TTR mAb приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

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

mAb	$k_d(1/MS)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$R_{max}$
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.

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 pH 4,0-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).

Полученные кривые связывания и сведенные значения  $K_d$  и  $V_{max}$  показаны на фиг. 3 и в табл. 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	$K_d$ (нМ)	$V_{max}$ (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.

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).

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 pH 4 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, полученным или денатурацией TTR, или обработкой TTR при pH 4.

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.

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.

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.

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 pH 4-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.

TTR и pH 4-TTR также подвергали электрофорезу в нативном геле для того, чтобы увидеть, спо-

собны 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 рН 4-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 рН 4-TTR. В противоположность этому 9D5 распознает только высокомолекулярные виды TTR, присутствующие в образце рН4-TTR. Как отмечалось в исследовании ДСН-ПААГ-электрофорез/Вестерн-блоттинг, 9D5 не распознает ни одного из нативных видов TTR.

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 рН4-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.

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).

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.

В табл. 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 рН4-TTR в диапазоне от 14,5 нМ (6C1) до 257 нМ (9D5) и значения  $V_{max}$  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 рН4-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 (рН4-TTR)		Вестерн-блоттинг			% Ингибирования Фибриллы (Тиофлавин-Т)
	$K_D$ (нМ)	$V_{max}$ (OD <sub>450</sub> п. е.)	ДСН-ПААГ электрофорез		Нативный (HMW- TTR)	
			(TTR)	(рН4- TTR)		
9D5	257	2,02	-	+++	+++	83
14G8	98,7	0,65	-	+++	++	65
6C1	14,6	1,07	-	+++	+++	72
5A1	21,3	1,61	-	+++	+++	100

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 табл. 4а). Изотипное контрольное mAb не вызывало ингибирования формирования фибрилл TTR (фиг. 4С), тем самым демонстрируя специфичность опосредованного 14G8 ингибирования.

Сопоставимые субстехиометрические значения  $IC_{50}$ , определенные для 5A1 и 6C1 (табл. 4а), предполагают 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 <sub>50</sub> ± средне-квадратическое отклонение (мг/мл)
9D5	Нет ингибирования
14G8	0,028 ± 0,009
6C1	0,048 ± 0,059
5A1	0,015 ± 0,02
EG 27/1	Нет ингибирования

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

"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" (1-0). Антитела, используемые для ИНС, описаны в табл. 5.

Таблица 5

Антитела, примененные для иммуногистохимического определения характеристик

Антитело	Тип антитела	Продавец	Окрашивание сердечной ткани	Концентрация
14G8	mis-TTR	Prothena Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
9D5	mis-TTR	Prothena Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
6C1	mis-TTR	Prothena Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
5A1	mis-TTR	Prothena Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
7G7	TTR	Prothena Biosciences	Да	0,5 мкг/мл
6F10	Изотипный контроль	Prothena 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

Образцы сердечной ткани были получены у пациентов с подтвержденными диагнозами мутаций ATTR. Демография для исследуемых иммуногистохимически случаев была следующей и представлена в табл. 6: FAS - наследственная амилоидная кардиомиопатия; FAP - наследственная амилоидная полинейропатия; 1° AL - амилоидоз легкой цепи; ATTR - транстиретиноопосредованный 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	Phe122	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

Мышиные моноклональные антитела (mAb к mis-TTR), созданные к фрагменту белка транстиретина 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 неактивными на сердечной ткани с ATTR, использованной в этом анализе, что указывает на то, что отложения были специфически характерными для TTR.

Шаблоны окрашивания антителами к mis-TTR сравнивали с окрашиванием, полученным с хорошо охарактеризованным коммерческим эталонным антителом к TTR (преальбумин, A0002; Dako; Карпентерия, 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.

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

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.

Сердечная ткань пациентов с подтвержденными диагнозами старческого системного амилоидоза или пациентов с подтвержденным FAC 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.

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, экспрес-

сированного 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 пласечного анализа Meso Scale Discovery (MSD).

Шесть образцов плазмы от пациентов с 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 пласечного теста MesoScale Discovery (MSD). Протоколы для этих анализов описаны в других местах, в "Материалы и методы" (p-r). Стандартная кривая была сгенерирована для пласечного анализа MSD с использованием 6C1.

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. Кроме того, образцы плазмы, полученные от пациентов с V30M, также содержали полосу примерно 30 кДа, которая движется 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.

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. 5A (9D5) и 5B (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).

12 образцов сыворотки, проанализированных Вестерн-блоттингом с 9D5 и 5A1, также анализировали с помощью пласечного 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.

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.

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  $271 \pm 185$  нг/мл. В противоположность этому средняя концентрация реакционноспособного TTR, присутствующего в образцах плазмы V30M, была выше, на уровне  $331 \pm 95$  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 гуманизованных антител 6C1.

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.

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 (см. 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 (см. 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 табл. 7) относится к традиционному классу 1, и CDR-H2 из 17 остатков относится к традиционному классу 1 (см. Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996). CDR-H3 не имеет традиционных классов.

Остатки в зоне взаимодействия доменов Vk и Vh являются такими, какие обычно можно наблю-

дать.

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 20TU) (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.

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 первичной Vk.

Были сконструированы шесть вариантов варибельной области гуманизированной тяжелой цепи и два варианта варибельной 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)) (табл. 7 и 8). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vh и Vk с обратными мутациями и другими мутациями на основе выбранных человеческих каркасов показаны в табл. 7 и 8 соответственно. Заштрихованные серым области в первом столбце в табл. 7 и 8 обозначают CDR, как определено по Чотиа, а заштрихованные серым в остальных столбцах в табл. 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 табл. 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 табл. 10.

Таблица 7

## Гуманизированные области Vh антитела 6C1

№ остатка по Чотиа	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	FR или CDR	VH остат (SEQ ID NO. 1) Fr1-VH1	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-	M	M	M	M	M	M	M	M

			H1								
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
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
			CDR-H2								
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
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-	F	Y	F	F	F	F	F	F

101	101	106	H3 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 Vк 6C1 антителя

№ остатка по Чотина	№ остатка по Кабару	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- L1	N	Y	N	N
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

## 036048

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
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
			L3				
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<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>

Вариант V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	Последовательность экзона акцептора V <sub>H</sub> или V <sub>L</sub>	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	Hu6C1VHv1	Hu6C1VHv1b	Hu6C1VHv2	Hu6C1VHv2b	Hu6C1VHv3	Hu6C1VHv3b	Hu6C1VLv1	Hu6C1VLv2
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	-	-

Выравнивание последовательности V<sub>H</sub> 6C1 мыши (SEQ ID NO: 1) с модельной последовательностью мыши (2OTU\_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 табл. 7. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 24, 48 и 73 по Кабату в табл. 7. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 37, 39, 45, 47, 91, 93 и 103 по Кабату в табл. 7.

Выравнивание последовательности V<sub>K</sub> 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 табл. 8. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 2, 48, 64 и 71 по Кабату в табл. 8. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 36, 38, 44, 87 и 98 по Кабату в табл. 8.

Обоснования выбора позиций, указанных в табл. 9 и 10, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, следующие.

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.

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

Обоснования выбора позиций, указанных в табл. 9 и 10, в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены следующие.

R19K - Lys образует H-связи с соседними остатками, тогда как Arg не образует.

G44R - Arg образует H-связи с остатком Phe98 интерфейса в легкой цепи, тогда как Gly не образует.

S49A - Ser может потенциально образовывать H-связь с Hys в CDR-H2.

N76S - по этому остатку наблюдается высокая степень дезамидирования. Ser является вторым наиболее частым в этой позиции в клетках зародышевой линии человека.

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.

N82(a)S - по этому остатку наблюдается высокая степень дезамидирования. Ser является вторым наиболее частым в этой позиции в клетках зародышевой линии человека.

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

V89M - Met образует H-связи с интерференционным остатком Tyr91 и, по-видимому, стабилизирует интерфейс, тогда как Val не взаимодействует с Tyr91.

Два варианта вариабельной области гуманизированной легкой цепи и два варианта вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи:

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

DvVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFQGSHVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO:16)

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

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFQGSHVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO:17)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSYISIDGNNIY  
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
S (SEQ ID NO:4)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVaYISIDGNNIY  
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
S (SEQ ID NO:5)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSYISIDGNNIY  
HPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQMsSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
(SEQ ID NO:6)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVaYISIDGNNIY  
HPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQMsSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
(SEQ ID NO:7)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLEWVSYISIDGNNIY  
HPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
S (SEQ ID NO:8)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLEWVaYISIDGNNIYH  
PDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYCARDSDYGYFDVWGQGLTIVTS  
(SEQ ID NO:9)

Пример 8. Кинетический анализ связывания гуманизированных антител 6C1.

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.

а. Протокол создания антител.

Мышей иммунизировали еженедельно антигенными пептидами TTR-MAP, TTR89-97-N-KLH или

TTR89-97-C-KLN в адьюванте RIBI или ежемесячно в адьюванте 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.

b. Протокол скрининга антител.

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 ч. Плашки блокировали 1%-ным раствором БСА/ФСБ, 200 мкл/луночка в течение 15 мин, затем добавляли 0,5 мкг/мл pH 4-TTR, 50 мкл/луночка и инкубировали в течение 1 ч. pH 4-TTR представляет собой TTR который подвергли воздействию низкого pH (50 мМ ацетата натрия, pH 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/луночку и инкубировали в течение 1 ч. Плашки дважды промывали TBS-T. Добавляли антитело обнаружения, козье-антимышиное (IgG1, 2a, 2b, 3 специфичное)-HRP, разбавленное 1:5000 в 0,5% БСА/ФСБ/TBS-T, 50 мкл/луночка, и инкубировали в течение 1 ч. Наконец, плашки промывали пять раз субстратом TBS-T и TMB, добавляли 100 мкл/луночка. Через 15 мин проявление субстрата останавливали 2N серной кислотой, 50 мкл/луночка. Плашки считывали при 450 нм. Были выбраны луночки 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 pH4-TTR в качестве отрицательного вторичного скрининга, что позволяет выбирать клоны, продуцирующие mAb к TTR, специфичные к ненативным формам TTR.

c. Протоколы экспрессии антител.

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.

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% CO<sub>2</sub> 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.

Культуру клеток собирали после того, как сперва позволяли клеткам в суспензии осесть 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 1×ФСБ, pH 7,4, используя FPLC (Akta Avant, GE Lifesciences). Несвязанные белки смывали с колонки 5-10 объемами колонки 1×ФСБ, pH 7,4 до достижения OD<sub>280</sub> исходного уровня. Связанное антитело элюировали из колонки 2 объемами колонки IgG Elution Buffer (Thermo Scientific). Фракции элюата собирали, и делали pH нейтральным с помощью 2M-ного Tris, pH 9,0 (60 мкл на 1 мл элюата).

Антителосодержащие фракции объединяли и диализовали в течение ночи при 4°C против 1×ФСБ, 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.

Клетки E. coli (BL21-A1) трансформировали плазмидой pET21a(+), содержащей вставку TTR (Met-hTTR-(His)<sub>6</sub> 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 мМ IPTG и 0,05% арабинозы.

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 мМ NaCl, 20 мМ имидазола) путем использования высокоскоростного прибора измельчения LV-1

(Microfluidics, Inc.). Лизированные клетки центрифугировали при 12,000× 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 мМ NaCl, 500 мМ имидазол). Пиковые фракции, соответствующие TTR, собирали, диализировали против 1×ФСБ и хранили при -80° С до использования.

f. Приготовление антигена TTR.

Нативный антиген TTR готовили путем разбавления концентрированного стока рекомбинантного TTR-6His до конечной концентрации 2,5 мкг/мл буфером 1×ФСБ. Обработанный рН4 TTR получали путем инкубации рекомбинантного TTR в 50 мМ ацетате натрия в концентрации 0,2 мг/мл, рН 3,95, в течение 72 ч при комнатной температуре. В этих условиях TTR диссоциирует на смесь мономеров и агрегированных форм TTR, которые структурно отличаются от нативного TTR. рН4-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/луночка 1,0 мкг/мл (Abcam № Ab9107) в 1×PBS в течение 1 ч. Раствор для покрытия отбрасывали, и плашку блокировали 250 мкл/луночка 1×BCA-содержащего блок-буфера, разбавленного в 1×ФСБ (G-Biosciences № 786-193) в течение 1 ч.

g. Протокол ELISA.

Покрытые и заблокированные 96-луночные плашки обрабатывали TTR-антигеном 50 мкл на луночку 2,5 мкг/мл (либо нативный TTR, либо рН4-TTR) в течение 1 ч при комнатной температуре. Плашки затем дважды промывали 250 мкл/луночка промывочного буфера (1×Трис-буферный солевой раствор, содержащий 0,05% Tween-20). Затем промытые плашки обрабатывали 50 мкл/луночка соответствующего моноклонального антитела против TTR в концентрациях от 0,31 до 2,5 мкг/мл в течение 1 ч.

Обработанные плашки промывали 3 раза 250 мкл/луночка промывочного буфера. После промывки плашки обрабатывали в течение 1 ч 50 мкл/луночка детектирующего антитела, содержащего разведенное 1:5000 в 1×ФСБ пероксидконъюгированное антитело козел-антимышь (Jackson ImmunoResearch № 115-035-164). Затем плашки промывали 3 раза перед добавлением 100 мкл субстрата ТМВ/луночка (Rockland). Реакции HRP разрешали продолжаться при комнатной температуре в течение 15 мин до гашения (quenching) 50 мкл 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на объем луночки. Спектроскопическая абсорбция измерялась при длине волны, равной 450 нм.

h. ДСН-ПААГ электрофорез.

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

i. Нативный ПААГ электрофорез.

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

j. Вестерн-блоттинг.

ДСН- или нативный ПААГ гели были блоттированы на нитроцеллюлозную фильтровальную бумагу (iBlot, программу P7) и заблокированы буфером для блокировки (Licor) в течение 30 мин. Затем фильтры инкубировали в 0,5 мкг/мл первичного антитела в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре (или в течение ночи при 4°С), а затем следовали три промывки 1×TBS, каждая по 10 мин. Фильтры помещали в IRDye 800CW-конъюгированное коза-антимышь вторичное антитело, разбавленное 1:20000 в буфере для блокирования. После инкубации фильтров в растворе вторичных антител в течение 1 ч при комнатной температуре фильтры промывали и отображали на инфракрасном тепловизоре Odyssey CLx (Licor).

k. Протокол анализа формирования фибрилл TTR.

Раствор 3,6 мкМ (0,2 мг/мл) TTR-Y78F в 50 мМ ацетате натрия, рН 4,8, инкубировали при 37°С в течение 72 ч 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 тиофлавина-Т и оставляли связываться в течение 30 мин. 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.

Свежемороженные 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 ИС антителами к каппа и лямбда-легким цепям и амилоиду A перед исследованием антител TTR.

м. Иммуногистохимия.

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 табл. 2) с последующей инкубацией с конъюгатами антител антимышь и антикролик 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: покраска Congo Red и тιοфлавином-Т.

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 ч с последующей дифференциацией в 1%-ном гидроксиде натрия в течение примерно 15 с. Затем микропрепараты ополаскивали в проточной воде, обезвоживали с помощью серии спиртов с возрастающими концентрациями, очищали с помощью трех смен ксилолов и накрывали покрывным стеклом CytoSeal 60.

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

о. Анализ изображений.

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.

Шесть образцов плазмы от пациентов с 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 1×LDS 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.

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

96-луночные плашки MSD покрывали моноклональным антителом 6C1 в концентрации 4 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре со встряхиванием или в течение ночи при 4°C. Плашки промывали три раза 1×TBST перед блокировкой 3%-ным раствором MSD Blocker A, 150 мкл/лунка в течение 1 ч 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 ч. Плашки промывали 3 раза 1×TBST. На 1 ч добавляли 50 мкл на объем лунки 1 мкг/мл сульфомеченого 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 1×TBST 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.

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.

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 ч при комнатной температуре со встряхиванием или в течение ночи при 4°C. Плашки промывали три раза 1×TBST перед блокировкой 3%-ным раствором MSD Blocker A, 150 мкл/луночка в течение 1 ч встряхивания. Зabloкированные плашки затем обрабатывали в течение 1 ч 50 мкл/луночка 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 ч при комнатной температуре при встряхивании. Как mAb 8C3, так и Dako были с присоединенным SulfoTag и могли быть использованы в качестве детектирующего антитела, поскольку они связываются с любым TTR и не являются конформационно специфичными.

После обработки детектирующим антителом плашки трижды промывали 150 мкл 1×TBST на объем лунки с последующим добавлением 150 мкл/луночка 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.

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.

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.

В альтернативном подходе агрегаты hTTR готовят *in vitro* и затем вводят в почку трансгенных мышей для заправки 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.

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 hTTR (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.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с транстиретином, содержащее согласно нумерации по Кабату три CDR тяжелой цепи: CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 11 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 12, и три CDR легкой цепи: CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 18, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 20.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит CDR-H1 по Кабату-Чотиа с последовательностью SEQ ID NO: 63.

3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно представляет собой моноклональное антитело.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно представляет собой мышинное, химерное, гуманизованное или венированное антитело.

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что оно имеет изотип IgG1 человека.

6. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что оно имеет изотип IgG2 или IgG4 человека.

7. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой гуманизованное антитело и содержит вариабельную область гуманизованной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область гуманизованной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 17.

8. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции H77 находится Т, причем позиции пронумерованы по Кабату.

9. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции H49 находится А, причем позиции пронумерованы по Кабату.

10. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позициях H76 и H82(a) находится S, причем позиции пронумерованы по Кабату.

11. Антитело по п.10, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции H49 находится А, причем позиции пронумерованы по Кабату.

12. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позициях H19, H44, H83 и H89 находятся соответственно К, R, К и М, причем позиции пронумерованы по Кабату.

13. Антитело по п.12, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции H49 находится А, причем позиции пронумерованы по Кабату.

14. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции L45 находится К, причем позиции пронумерованы по Кабату.

15. Антитело по п.14, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции L2 находится V, причем позиции пронумерованы по Кабату.

16. Антитело по любому из пп.8-13, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции L45 находится К, причем позиции пронумерованы по Кабату.

17. Антитело по п.16, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором в позиции L2 находится V, причем позиции пронумерованы по Кабату.

18. Антитело по п.7, которое представляет собой гуманизованное антитело и 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.

19. Антитело по п.18, которое представляет собой гуманизованное антитело и 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.

20. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

21. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

22. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

23. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

24. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

25. Антитело по п.8, которое представляет собой гуманизованное антитело, в котором вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

26. Антитело по любому из пп.20-25, которое представляет собой гуманизованное антитело, в ко-



цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 28.

55. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела, как описано в любом из пп.1-47 и 51-54, или антигенсвязывающего фрагмента, как описано по любому из пп.48-50.

56. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.55.

57. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии по п.56.

58. Способ гуманизации мышинового антитела по п.4, включающий:

а) выбор акцепторного антитела;

б) идентификацию аминокислотных остатков каркаса мышинового антитела по п.4, 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 зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и

вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

59. Способ продуцирования гуманизованного, химерного или венероантитела по п.4, включающий:

а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела по п.4, так что клетки секретируют антитело; и

б) очистку антитела от клеточной культуральной среды.

60. Способ создания клеточной линии, продуцирующей гуманизованное, химерное или венероантитело по п.4, включающий:

а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи указанного антитела по п.4 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

г) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода антитела.

61. Способ по п.60, отличающийся тем, что он дополнительно включает размножение клеток в селективных условиях и скрининг для обнаружения линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих антитело в количестве по меньшей мере  $100 \text{ мг/л}/10^6$  клеток/24 ч.

62. Способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта с транстиретинопосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

63. Способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта с транстиретинопосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50, тем самым ингибируя или уменьшая накопление транстиретина у субъекта.

64. Способ уменьшения количества отложений транстиретина у субъекта с транстиретинопосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50, тем самым уменьшая количество отложений транстиретина у субъекта.

65. Способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта с транстиретинопосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50, тем самым устраняя агрегаты транстиретина у субъекта по сравнению с субъектом, имеющим транстиретинопосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

66. Способ стабилизации нетоксичной формы транстиретина у субъекта с транстиретинопосредованным амилоидозом или риском его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50, тем самым стабилизируя нетоксичную форму транстиретина у субъекта.

67. Способ диагностирования транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта с антителом по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.48-50 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с транстиретином, причем присутствие связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.

68. Способ по п.67, отличающийся тем, что он дополнительно включает сравнение связывания ан-

титела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом со связыванием антитела или антигенсвязывающего фрагмента с контрольным образцом, полученным от здорового субъекта, при этом повышенное связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстретиноповосредованный амилоидоз.

69. Способ по п.68, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения.

70. Способ по любому из пп.67-69, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань.

71. Способ по п.70, отличающийся тем, что плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

72. Способ по любому из пп.62-71, отличающийся тем, что транстретиноповосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстретиновый амилоидоз или спорадический транстретиновый амилоидоз.

73. Способ по п.72, отличающийся тем, что наследственный транстретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (FAC), наследственную амилоидную полинейропатию (FAP) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA).

74. Способ по п.72, отличающийся тем, что спорадический транстретиновый амилоидоз представляет собой старческий системный амилоидоз (SSA) или старческий сердечный амилоидоз (SCA).

75. Способ по любому из пп.62-71, отличающийся тем, что транстретиноповосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах или желудочно-кишечном тракте субъекта.

76. Способ выявления присутствия или отсутствия отложений транстретина у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта, подозреваемого в наличии амилоидного накопления, с эффективным количеством антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с транстретином, причем обнаружение связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента указывает на наличие отложений транстретина.

77. Способ по п.76, отличающийся тем, что он дополнительно включает сравнение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом со связыванием антитела или антигенсвязывающего фрагмента с контрольным образцом, полученным от здорового субъекта, при этом повышенное связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстретиноповосредованный амилоидоз.

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

79. Способ по п.76 или 77, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань.

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

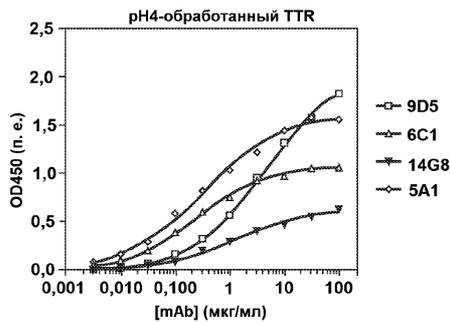
81. Способ определения количества отложений транстретина у субъекта, включающий введение антитела по любому из пп.1-47 и 51-54 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.48-50 и обнаружение присутствия связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента у субъекта, где присутствие связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента определяется с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

	10	20	30	40	
m6C1VH	EVQLVESGGGLVQP	GGSLKLSCAASG	GFTFSNY	YMSWVRQT	40
20TU_B.pro	QVQLQESGGGLVQP	GGSLKLSCAASG	FTFRDY	MYWVRQT	40
ADX65650	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAASG	FTFSYEM	NWVRQA	40
Hu6C1VHv1	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
Hu6C1VHv1b	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
Hu6C1VHv2	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
Hu6C1VHv2b	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
Hu6C1VHv3	EVQLVESGGGLVQP	GGSLKLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
Hu6C1VHv3b	EVQLVESGGGLVQP	GGSLKLSCAASG	FTFSNY	YMSWVRQA	40
	50	60	70	80	
m6C1VH	PEKRLEWVA	YISIDGNNI	YHPDSVKGR	FTISRDN	AKNTLY 80
20TU_B.pro	PEKRLEWVA	FISNGGG	STIYPD	VTKGRFT	ISRDN
ADX65650	PGKGLEWV	SYISSSG	STIYAD	SVKGRFT	ISRDN
6C1VHv1	PGKGLEWV	SYISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
Hu6C1VHv1b	PGKGLEWV	YISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
Hu6C1VHv2	PGKGLEWV	YISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
Hu6C1VHv2b	PGKGLEWV	YISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
Hu6C1VHv3	PGKRLWV	YISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
Hu6C1VHv3b	PGKRLWV	YISIDG	NNIYHP	DSVKGR	FTISR
	90	100	110		
m6C1VH	LQMSLKS	EDTAMYY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
20TU_B.pro	LQMSRLK	SEDAMYY	CARGR	YVWFAY	WGQTL
ADX65650	LQMNSLR	AEDTAVY	CARDL	SGSYGY	WGQTL
Hu6C1VHv1	LQMNSLR	AEDTAVY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
Hu6C1VHv1b	LQMNSLR	AEDTAVY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
Hu6C1VHv2	LQMNSLR	AEDTAVY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
Hu6C1VHv2b	LQMNSLR	AEDTAVY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
Hu6C1VHv3	LQMNSLK	AEDTAMYY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL
Hu6C1VHv3b	LQMNSLK	AEDTAMYY	CARDSD	YGYFDV	WGQTL

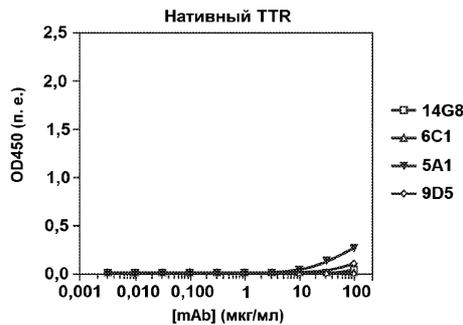
Фиг. 1

	10	20	30	40	
m6C1VL	DVLMTQTPLSLP	VS LGDQASIS	CRSSQ	SIVH	SNGNTYLEW 40
3EYS_L St.pro	DVLMTQTPLSLP	VS LGDQASIS	CRSSQ	SIVH	SNGNTYLEW 40
ABI74084	DIVMTQTPLSLP	VTPEPASIS	CRSSQ	SLH	SNGNYLW 40
Hu6C1VLv1	DVVMTQTPLSLP	VTPEPASIS	CRSSQ	SIVH	SNGNTYLEW 40
Hu6C1VLv2	DIVMTQTPLSLP	VTPEPASIS	CRSSQ	SIVH	SNGNTYLEW 40
	50	60	70	80	
m6C1VL	YLQKRQ	SPKLLI	YKVS	KRFS	GVPDR
3EYS_L St.pro	YLQKPG	QSPKLLI	YKVS	NRFS	GVPDR
ABI74084	YLQKPG	QSPQLLI	YLG	SNRAS	GVPDR
Hu6C1VLv1	YLQKRQ	SPKLLI	YKVS	KRFS	GVPDR
Hu6C1VLv2	YLQKPG	QSPKLLI	YKVS	KRFS	GVPDR
	90	100	110		
m6C1VL	SRVEA	EDLVYYC	FQGS	HVPLT	FGG
3EYS_L St.pro	SRVEA	EDLVYYC	FQGS	HVPLT	FGG
ABI74084	SRVEA	DVGVYYC	MQGL	QTPLT	FGG
Hu6C1VLv1	SRVEA	DVGVYYC	FQGS	HVPLT	FGG
Hu6C1VLv2	SRVEA	DVGVYYC	FQGS	HVPLT	FGG

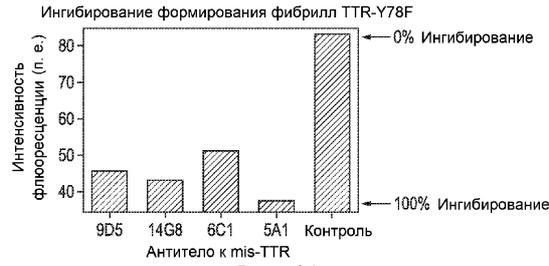
Фиг. 2



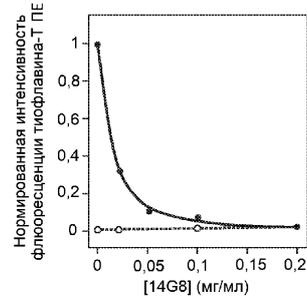
Фиг. 3А



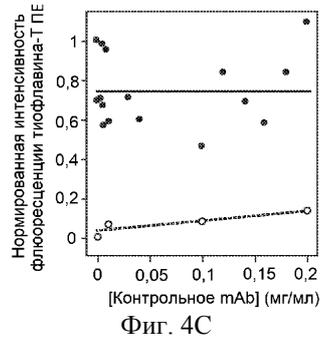
Фиг. 3В



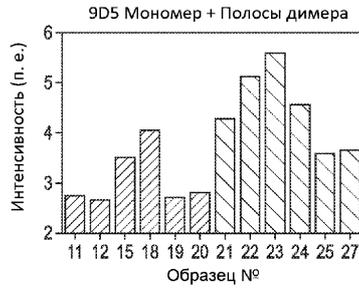
Фиг. 4А



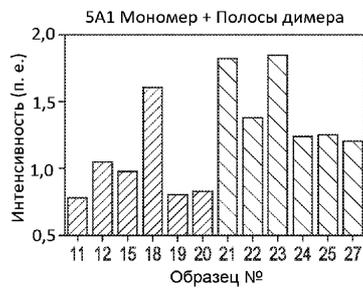
Фиг. 4В



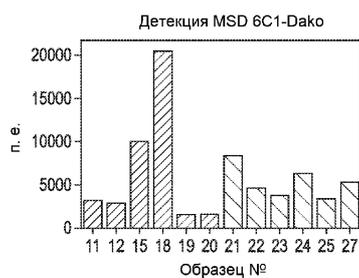
Фиг. 4С



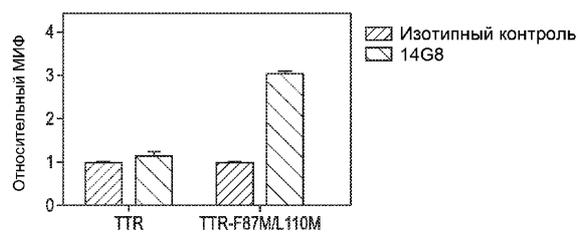
Фиг. 5А



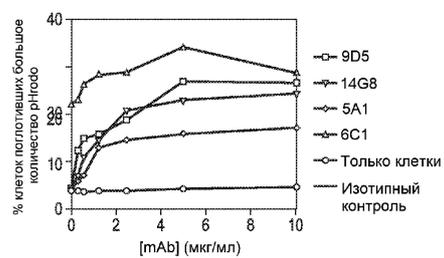
Фиг. 5В



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

