

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036059**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.21**

**(21)** Номер заявки  
**201790858**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2008.12.29**

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

---

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛА ИЛИ ЕГО ФРАГМЕНТА, КОТОРОЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЕТСЯ С АГРЕГИРОВАННЫМ АМИЛОИДНЫМ БЕЛКОМ**

---

**(31)** 61/007,544; 61/095,932

**(32)** 2007.12.28; 2008.09.10

**(33)** US

**(43)** 2017.08.31

**(62)** 201070812; 2008.12.29

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОТЕНА БАЙОСАЙЕНСИЗ  
ЛИМИТЕД (IE); ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ТЕННЕССИ РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН  
(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Шенк Дейл Б., Сейберт Питер А.,  
Уолл Джонатан (US), Сальданха Хосе  
(GB)**

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

**(56)** MALLE E. et al. Mapping of antigenic determinants of purified, lipid-free human serum amyloid a proteins. *Scand. J. Immunol.* 48, 557-561, 1998, abstract, p. 558-560

FRANKENBERGER B. et al. Epitope mapping of amyloid-a protein using monoclonal antibodies. *Amyloid and Amyloidosis*, 1990, Springer Science+Business Media Dordrecht, 1991, p. 88

MALLE Ernst et al. Quantification and mapping of antigenic determinants of serum amyloid A (SAA) protein utilizing sequence-specific immunoglobulins and Eu<sup>3+</sup> as a specific probe for time-resolved fluorometric immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 182 (1995), 131-144, abstract, p. 134-135  
WO-A1-2007112566

MCDONALD Thomas L. et al. A monoclonal antibody sandwich immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. *Journal of Immunological Methods*, 144 (1991), 149-155, p. 151

---

**(57)** Изобретение относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с агрегированным амилоидным белком, где способ включает синтез или рекомбинантную экспрессию антитела и выделение антитела, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 168, 169 и 170; или вариабельную область легкой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 177, 169 и 170; и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 171, 172 и 173.

---

**B1**

**036059**

**036059 B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Приоритет испрашивается по предварительной заявке США № 61/095932, поданной 10 сентября 2008 г., и предварительной заявке США № 61/007544, поданной 28 декабря 2007 г., каждая из которых включена в настоящее изобретение полностью посредством ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к областям иммунологии и медицины.

### Уровень изобретения

Амилоидоз является общим термином, который описывает ряд заболеваний, характеризующихся наличием патологических форм амилоидных белков, при которых часто наблюдается внеклеточное отложение (депонирование) белковых фибрилл, образующих многочисленные "амилоидные депо" или "амилоидные бляшки", расположенные локально или системно. Такие депо или бляшки состоят, прежде всего, из растворимого белка или пептида природного происхождения, который собирается в тканях разной локализации в виде больших нерастворимых скоплений диаметром 10-100 мкм. Депо состоят в общем из латеральных скоплений фибрилл, имеющих диаметр примерно от 10 до 15 нм. Амилоидные фибриллы производят характерное светло-зелёное двупреломление в поляризованном свете при окрашивании красителем Конго красным. В общем фибриллярное строение этих депо представляет собой идентифицирующий признак для разных форм амилоидного заболевания.

Пептиды или белки, образующие бляшечные депо, часто происходят из более крупного белка-предшественника. Более конкретно, в патогенез амилоидных агрегатов, таких как фибриллярные депо, обычно вовлечено протеолитическое расщепление "патологического" белка-предшественника на фрагменты, которые агрегируются в непараллельные  $\beta$ -складчатые листы. Фибриллярное строение указанных депо является идентифицирующим признаком разных форм амилоидного заболевания. Например, интрацеребральные и цереброваскулярные депо, состоящие в основном из фибрилл бета-амилоидного пептида ( $\beta$ -АР), характерны для болезни Альцгеймера (как семейной, так и спорадической форм), островковый амилоидный полипептид (IAPP; амилин) характерен для фибрилл амилоидных депо в панкреатических островковых клетках, связанных с диабетом II типа, и  $\beta$ 2-микроглобулин представляет собой основной компонент амилоидных депо, которые образуются вследствие продолжительного проведения гемодиализа. Позднее амилоидными заболеваниями были также признаны прион-ассоциированные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельдта-Якоба.

В общем патологические первичные амилоидозы отличаются присутствием белковых фибрилл с "амилоидным типом легкой цепи" (AL-типом), называемых так по гомологии N-терминальной области AL-фибрилл и варибельного фрагмента легкой цепи иммуноглобулина (каппа или лямбда).

Разные формы заболевания были разделены на классы, главным образом исходя из связи амилоидоза с основным системным заболеванием. Таким образом, считается, что некоторые патологические состояния являются первичными амилоидозами, при которых не подтверждается предшествующее наличие заболевания или его существование в качестве сопутствующей патологии. При вторичном или реактивном амилоидозе (тип АА), который характеризуется наличием фибриллярных депо амилоидного белка (АА), выявляется основное или ассоциированное хроническое воспалительное или инфекционное патологическое состояние.

При семейно-наследственных амилоидозах возможно наличие ассоциированных нейропатических, почечных или сердечно-сосудистых депо ATTR-типа (транстиретинового). Другие семейно-наследственные амилоидозы включают другие синдромы и могут иметь разные амилоидные компоненты (например, семейная средиземноморская лихорадка, для которой характерны АА-фибриллы). Другие формы амилоидоза включают локализованные формы, отличающиеся фокальными, часто опухолеподобными депо, которые возникают в отдельных органах. Другие амилоидозы связаны со старением и обычно характеризуются образованием бляшки в сердце или мозге. Также распространены амилоидные депо, связанные с продолжительным гемодиализом. Сведения об этих и других формах амилоидного заболевания объединены в табл. 1 (Tan, S.Y. and Pepys, *Histopathology*, 25:403-414, 1994; *Harrison's Handbook of Internal Medicine*, 13<sup>th</sup> Ed., Isselbacher, K.J., et al., eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995) и описаны в патентах США № 6875434, 6890535, 6913745, 6923964 и 6936246, которые полностью включены путем ссылки в настоящий документ.

Таблица 1

## Классификация амилоидных заболеваний

Амилоидный белок / пептид	Белок-предшественник	Варианты белков	Клинические проявления
AA	Сывороточный А-амилоидный белок (АpoSSA)		Реактивный (вторичный) амилоидоз: семейная средиземноморская лихорадка, семейная амилоидная нефропатия с крапивницей и глухотой (синдром Макла-Уэллса)
AA	Сывороточный А-амилоидный белок (АpoSSA)		Реактивный системный амилоидоз, связанный с системными воспалительными заболеваниями

AL	Легкие цепи моноклонального иммуноглобулина (каппа, лямбда)	Аκ, А, (например, АκIII)	Идиопатический (первичный) амилоидоз: связанный с миеломой или макроглобулинемией; системный амилоидоз, связанный с иммуноцитарной дискразией; моноклональная гаммопатия; окулярная дискразия; локальный нодулярный амилоидоз, связанный с хроническими воспалительными заболеваниями
AH	IgG (1(γ1))	Aγ1	Амилоидоз, связанный с несколькими иммуноцитарными дискразиями, тяжелая цепь
ATTR	Транстиретин (TTR)	По меньшей мере 30 известных точечных мутаций	Семейная амилоидная полинейропатия (например, метионин Met30, португальский тип)

ATTR	Транстиретин (TTR)	например, Met111	Семейная амилоидная кардиомиопатия (датский тип)
ATTR	Транстиретин (TTR)	Дикий тип TTR или изолейцин Ile122	Системный сенильный амилоидоз
ApoAI	ApoAI	Аргинин Arg26	Семейная амилоидная полинейропатия
Agel	Гельсолин	Аспарагин Asn187	Семейный амилоидоз (финского типа)
Acys	Цистатин С	Глутамин Gln68	Наследственная церебральная геморрагия с амилоидозом (исландский тип)
A $\beta$	$\beta$ -амилоидный белок- предшественник (например $\beta$ - APP <sub>695</sub> )	Вариант: Gln618	Болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, наследственный церебральный геморрагический амилоидоз (голландский тип), спорадическая церебральная амилоидная ангиопатия, миозит с инклюзионными тельцами
AV <sub>2</sub> M	Бета <sub>2</sub> - микроглобулин		Связанный с хроническим гемодиализом

Aca1	(Про) кальцитонин	(Про) кальцитонин	Медуллярная карцинома щитовидной железы
AANF	Атриальный натрийуретический фактор,		Фокальные сенильные амилоидозы: Изолированный атриальный амилоид;
A $\beta$	$\beta$ -амилоидный белок- предшественник		Мозг
SVEP <sup>a</sup>	-		Семенные пузырьки
AB <sub>2</sub> M	бета <sub>2</sub> - микроглобулин		Простата
	Кератин		Первичный локализованный кожный амилоид (макулярный, папулезный)
PrP	Блок- предшественник прионов (33-35 кДа, клеточная форма)	Белок скрепи (Scrapie) 27-30 кДа	Спорадическая болезнь Крейтцфельдта - Якоба, болезнь куру (трансмиссивные спонгиформные энцефалопатии, прионные болезни)
AIAPP	Островковый амилоидный полипептид (IAPP)		Островки Лангерганса; Диабет типа II; Инсулинома
Пептидные гормоны, фрагменты	например, прекальцитонин		Экзокринный амилоидоз, связанный с апудомами

<sup>a</sup> Белок экзокринного семенного пузырька.

Часто фибриллы, образующие большую часть амилоидного депо, происходят из одного или нескольких первичных белков-предшественников или пептидов и обычно связываются с сульфатированными гликозаминогликанами. Кроме того, амилоидные депо могут включать незначительное количество белков и пептидов разных типов, наряду с другими компонентами, такими как протеогликаны, ганглиозиды и другие сахара, как описано более подробно в нижеследующих разделах.

Фибриллы AA-типа состоят из пептидных фрагментов, размер которых варьирует, но в общем составляет около 8000 Да (AA-пептид или белок), которые образуются путем протеолитического расщепления сывороточного А-амилоидного белка (SSA), циркулирующего аполипопротеина, который присутствует в частицах ЛПВ (липопротеинов высокой плотности) и синтезируется в гепатоцитах в ответ на такие цитокины, как интерлейкин (IL)-1 и IL-6, а также фактор некроза опухолей TNF- $\alpha$ . См. Husby, G. et al. Amyloid 1, 119-137 (1994). Протеолитическое расщепление приводит к патологическому накоплению N-терминального остатка около 76 аминокислот от двух третей белка SAA. Концентрация SAA в плазме человека обычно составляет около 0,1 мг/мл, но в ответ на воспалительный стимул может повышаться более чем в 1000 раз. Частью указанного процесса является протеолиз молекулы SAA, и продукт N-терминального расщепления систематически накапливается в виде AA-фибрилл в жизненно-важных органах, включающих печень, селезенку, почки и надпочечники. Обычно накопление часто происходит также в сердце и желудочно-кишечном тракте.

В общем амилоидоз АА-типа является проявлением заболеваний, которые вызывают устойчивый острофазовый ответ. Такие заболевания включают хронические воспалительные заболевания, хронические локальные или системные микробные инфекции и злокачественные новообразования. Амилоидные заболевания АА-типа включают без ограничения воспалительные заболевания, такие как ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориатическую артропатию, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета и болезнь Крона. Депо АА также образуются в результате хронических микробных инфекций, таких как лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит и болезнь Уиппла. Некоторые злокачественные новообразования могут также вызывать образование АА-фибрилярных амилоидных депо. Они включают такие патологии, как ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочеполового тракта, базальноклеточная карцинома и волосатоклеточный лейкоз. Амилоидное заболевание АА-типа также может быть результатом наследственных воспалительных заболеваний, таких как семейная средиземноморская лихорадка. Дополнительно, амилоидное заболевание АА-типа может быть обусловлено лимфопролиферативными заболеваниями, такими как болезнь Кастлемана.

Амилоидоз АА-типа развивается без явной симптоматики и прогрессирует. Обычно симптомы выявляются на более поздних стадиях болезни. Часто пациент остается недиагностированным до появления тяжелого органного поражения. Накопление фибрилл АА-типа происходит в жизненно важных органах и приводит к дисфункции органа и впоследствии к смерти. Уровень пятилетнего выживания составляет 45-50%. После диагностики средняя выживаемость составляет от 4 до 8 лет. Заболевания почек на последней стадии являются причиной смерти в 40-60% случаев. См. Gillmore J.D. et al., *Lancet*, 358:24-9 (2001).

В настоящее время не существует каких-либо одобренных амилоид-специфических способов лечения какой-либо из амилоидных заболеваний, включающих амилоидоз АА-типа. См. Gillmore J.D. et al., *Lancet*, 358:24-9 (2001). При наличии основного или сопутствующего заболевания терапия направлена на уменьшение выработки амилоидогенного белка путем лечения основного заболевания. Например, современная стратегия лечения амилоидоза АА-типа нацелена на основной воспалительный процесс путем уменьшения уровня белка АроSSA ниже 10 мг/л. Применяемые в настоящее время способы лечения включают химиотерапию (хлорамбуцил и метотрексат MTX), иммунодепрессанты (азатиоприн), противовоспалительные лекарства (колхицин) и ингибиторы TNF. Таким образом, настоящее изобретение осуществляет давнюю потребность в схемах лечения для улучшения состояния при амилоидозе АА-типа или для профилактики указанной патологии.

#### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к выделенному человеческому, гуманизированному или химерному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом в пределах 70-76 остатков человеческого амилоидного пептида, например с эпитопом в пределах 70-76 остатков последовательности SEQ ID NO: 2, или с эпитопом, содержащим остатки, представленные как SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению включают те из них, которые конкурируют за связывание с человеческим амилоидным пептидом с антителом 2A4, продуцируемым под инвентарным номером ATCC JH80 2A4.20.44077, или с антителом 7D8, продуцируемым под инвентарным номером ATCC JH80 7D8.29.19.47. Дополнительные антитела по изобретению конкурируют за связывание с человеческим А-амилоидным пептидом с антителом, имеющим переменную область легкой цепи, представляющую собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152 или остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153 и переменную область тяжелой цепи, представляющую собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154.

Раскрытые в изобретении антитела включают гуманизированные и химерные версии антитела 2A4, или гуманизованную или химерную версию антитела 7D8.

Например, типичные антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, содержащую один или несколько участков, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи антитела 2A4, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, или один или несколько участков, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи 7D8, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153. В качестве другого примера типичные антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, содержащую два участка, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи 2A4, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, или два участка, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи 7D8, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153. Дополнительные типичные антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи 2A4, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, или три участка, определяющих комплементарность, переменной области легкой цепи 7D8, представленной как остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153. Типичные версии гуманизированных антител 2A4 или 7D8 содержат по меньшей мере один остаток карбонильного участка легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из L87 и L90 (соглашение о нумерации





цепи Vk, которая содержит последовательности, указанные как SEQ ID NO: 166 или 167. В конкретных аспектах изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, образованную остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153, или такие как SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 или 176.

Типичные антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению также включают те из них, которые содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую один или несколько участков, определяющих комплементарность, переменной области тяжелой цепи 2A4, представленной как остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154, например, содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую два участка, определяющих комплементарность, в переменной области тяжелой цепи 2A4, представляющую собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154, или переменную область тяжелой цепи, содержащей три участка, определяющих комплементарность, в переменной области тяжелой цепи 2A4, представляющую собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154. Типичные гуманизированные антитела 2A4 и 7D8 и антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из H37, H49, H70 и H93 (соглашение о нумерации по Kabat), который занят I, A, F или V соответственно и в котором остаток из переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина. Типичные гуманизированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (линейная нумерация), который занят R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V или A соответственно и в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина. Например, типичные гуманизированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из +37, +49, +73 и +99 (линейная нумерация), который занят I, A, F или V соответственно и в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина.

Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению включают те из них, которые содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую

остаток каркасного участка в +10 (линейная нумерация), занятый R, при этом остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +15 (линейная нумерация), занятый K, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +19 (линейная нумерация), занятый K, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +37 (линейная нумерация), занятый I, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +49 (линейная нумерация), занятый A, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +73 (линейная нумерация), занятый F, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +78 (линейная нумерация), занятый Q, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты переменной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +79 (линейная нумерация), занятый S, в котором остаток переменной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в переменной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты вариабельной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +80 (линейная нумерация), занятый M, в котором остаток вариабельной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в вариабельной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты вариабельной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +87 (линейная нумерация), занятый N, в котором остаток вариабельной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в вариабельной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты вариабельной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +95 (линейная нумерация), занятый M, в котором остаток вариабельной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в вариабельной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина;

антитела и антигенсвязывающие фрагменты вариабельной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +99 (линейная нумерация), занятый V, в котором остаток вариабельной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в вариабельной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина; и

антитела и антигенсвязывающие фрагменты вариабельной области тяжелой цепи, содержащие остаток каркасного участка в +109 (линейная нумерация), занятый A, в котором остаток вариабельной области тяжелой цепи занят соответствующим остатком в вариабельной области тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина.

Вариабельная область тяжелой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина включает человеческую вариабельную область тяжелой цепи гамма-подгруппы 3 (соглашение о нумерации по Kabat), например человеческую вариабельную область тяжелой цепи гамма-подгруппы 3, содержащую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 165, такую как вариабельная область тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, представляющую собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154 или указанную как SEQ ID NO: 161, 162 или 163.

Дополнительные примеры антител и антигенсвязывающих фрагментов содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, из вариабельной области легкой цепи 2A4, которые представляют собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, или три участка, определяющих комплементарность, из вариабельной области легкой цепи 7D8, которые представляют собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, из вариабельной области тяжелой цепи 2A4, представляющую собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154. Например, такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают те из них, которые имеют вариабельную область легкой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, указанные как SEQ ID NO: 168, 169 и 170, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, указанные как SEQ ID NO: 171, 172 и 173. В качестве другого примера такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают те из них, которые имеют вариабельную область легкой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, которые представляют собой SEQ ID NO: 177, 169 и 170, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три участка, определяющих комплементарность, которые представляют собой SEQ ID NO: 171, 172 и 173. В другом примере такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают те из них, которые имеют вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая представляет собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152 или остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая представляет собой остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154. В качестве другого примера такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают те из них, которые имеют вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 или 176, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 161, 162 или 163.

В конкретных аспектах по настоящему изобретению антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 155, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO: 161;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 155, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO: 162;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 155, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 163;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 156, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последова-



вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 176, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO: 162; или

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 176, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 163.

Также настоящее изобретение рассматривает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие человеческое, гуманизованное или химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 человеческого А-амилоидного пептида, и включает все указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные выше в настоящем документе и приведенные в формуле изобретения. Дополнительно, изобретение относится к клеткам, экспрессирующим указанные нуклеиновые кислоты.

В других аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, где  $X_1$  и  $X_2$  являются любой аминокислотой. Такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают человеческие, гуманизованные или химерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, например те из них, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 в человеческом А-амилоидном пептиде.

Дополнительные примеры антител и антигенсвязывающих фрагментов включают такие, где

$X_1$  представляет собой H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I или W и  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y или Q; или

$X_1$  представляет собой H, T, F, S, P или A и  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, D или A; или

$X_1$  является H, T, F или A и  $X_2$  является T, S, E, D или A; или

$X_1$  является H, T, F или A и  $X_2$  является T, S, E, D или A; или

$X_1$  является H, T или A и  $X_2$  является T, S, E или A; или

$X_1$  является H или A и  $X_2$  представляет собой T, S или A; или

$X_1$  является H и  $X_2$  является T или A; или

$X_1$  является A и  $X_2$  представляет собой S, T, E или V; или

$X_1$  представляет собой A и  $X_2$  представляет собой S, T или E; или

$X_1$  представляет собой T и  $X_2$  представляет собой E; или

$X_1$  представляет собой F и  $X_2$  представляет собой D; или

$X_1$  представляет собой S и  $X_2$  представляет собой E, F или A; или

$X_1$  является P и  $X_2$  представляет собой E, I или F.

Например, такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с и представляют собой, FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) и SEDA (SEQ ID NO: 25); или с эпитопом, состоящим из аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), SEDF (SEQ ID NO: 24) и SEDA (SEQ ID NO: 25), или с эпитопом, состоящим из аминокислотной последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), SEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

В агрегированном амилоидном белке можно обнаружить раскрытые в изобретении эпитопы, например

эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из GHGAEDS (SEQ ID NO: 4), GHDAEDS (SEQ ID NO: 5), GDHAEDS (SEQ ID NO: 7), STVIEDS (SEQ ID NO: 8) и GRGHEDT (SEQ ID NO: 9); или

эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность GHGAEDS (SEQ ID NO: 4); или эпитоп, содержащий аминокислоты HEDT (SEQ ID NO: 12); или

эпитоп, содержащий аминокислоты HEDA (SEQ ID NO: 15); или

эпитоп, содержащий аминокислоты AEDS (SEQ ID NO: 13); или

эпитоп, содержащий аминокислоты AEDT (SEQ ID NO: 14); или

эпитоп, содержащий аминокислоты TEDE (SEQ ID NO: 16); или

эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность AEDV (SEQ ID NO: 23); или

эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность SEDF (SEQ ID NO: 24) или PEDF (SEQ ID NO: 22); или

эпитоп, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из PEDS (SEQ ID NO: 26), PEDL (SEQ ID NO: 27), TEDV (SEQ ID NO: 28), AEDE (SEQ ID NO: 19), SEDI (SEQ ID NO: 29) и TEDT (SEQ ID NO: 30); или

эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

LEDG (SEQ ID NO: 31), AEDM (SEQ ID NO: 32), HEDS (SEQ ID NO: 33), CEDD (SEQ ID NO: 34), QEDS (SEQ ID NO: 35), REDS (SEQ ID NO: 36), TEDG (SEQ ID NO: 16), QEDR (SEQ ID NO: 38), TEDL (SEQ ID NO: 39), PEDN (SEQ ID NO: 40), EEDP (SEQ ID NO: 41), LEDL (SEQ ID NO: 42), KEDA (SEQ ID NO: 43), SEDC (SEQ ID NO: 44), EEDD (SEQ ID NO: 45), SEDK (SEQ ID NO: 46), DEDD (SEQ ID NO: 47), DEDG (SEQ ID NO: 13), LEDE (SEQ ID NO: 49), GEDA (SEQ ID NO: 13), VEDF (SEQ ID NO: 51), YEDE (SEQ ID NO: 52), IEDL (SEQ ID NO: 53), WEDY (SEQ ID NO: 54), DEDW (SEQ ID NO: 55), SEDL (SEQ ID NO: 56), YEDQ (SEQ ID NO: 57), LEDW (SEQ ID NO: 58), YEDR (SEQ ID NO: 59) и PEDK (SEQ ID NO: 60).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, включают те из них, которые связываются с амилоидным белком в мономерной форме с аффинностью, составляющей менее чем примерно  $10^7 \text{ M}^{-1}$ . Типичные амилоидные белки включают сывороточный амилоидный белок (SAA), белок легкой цепи иммуноглобулина (такой как VL6 Wil и VK), человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR) и аполипопротеин A1 (ApoA1).

Также настоящее изобретение рассматривает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами, и включает все указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные выше и приведенные в формуле настоящего изобретения. Дополнительно рассматриваются клетки, экспрессирующие указанные нуклеиновые кислоты.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам терапевтического лечения или профилактики субъекта с выявленным амилоидозом AA-типа, с применением человеческого, гуманизованного или химерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 в человеческом A-амилоидном пептиде, например с эпитопом в пределах остатков 70-76 последовательности SEQ ID NO: 2. Субъекты, для которых могут быть полезными раскрытые в изобретении терапевтические способы лечения амилоидоза AA-типа, включают субъектов, страдающих амилоидным заболеванием, которое выбрано из группы, состоящей из следующих патологий: ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета и болезнь Крона, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочеполового тракта, базальноклеточная карцинома, волосатоклеточный лейкоз, семейная средиземноморская лихорадка, болезнь Кастлемана. Субъекты, для которых могут быть полезными раскрытые в изобретении способы профилактики, включают субъекты, предрасположенные к развитию любого из вышеуказанных заболеваний или находящиеся в группе риска.

Также настоящее изобретение рассматривает способы терапевтического лечения или профилактического лечения субъекта, страдающего амилоидозом, связанным с наличием агрегированного амилоидного белка, который содержит аминокислотную последовательность ED, с использованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами. В число субъектов, для которых могут быть полезными раскрытые в изобретении терапевтические способы лечения амилоидоза, связанного с агрегированным амилоидным белком, входят субъекты, страдающие амилоидозом AA-типа, амилоидозом AL-типа, болезнью Альцгеймера, умеренным когнитивным нарушением, амилоидной полинейропатией, средиземноморской лихорадкой, синдромом Макла-Уэллса, реактивным системным амилоидозом, связанным с системными воспалительными заболеваниями, амилоидозом, связанным с миеломой или макроглобулинемией, амилоидозом, связанным с иммуноцитарной дискразией, моноклональной гаммапатией, оккультной дискразией, и страдающие локальным нодулярным амилоидозом, связанным с хроническими воспалительными заболеваниями. В число субъектов, для которых могут быть полезными раскрытые в изобретении способы профилактики, входят субъекты, предрасположенные или имеющие риск развития любого из вышеуказанных заболеваний. В одном аспекте изобретения амилоидный белок содержит аминокислотную последовательность AEDV (SEQ ID NO: 23), и терапевтическое или профилактическое лечение осуществляют путем применения раскрытых в изобретении способов лечения амилоидогенного заболевания, которая представляет собой амилоидоз AA-типа, амилоидоз AL-типа, амилоидную полинейропатию, средиземноморскую лихорадку, синдром Макла-Уэллса, реактивный системный амилоидоз, связанный с системными воспалительными заболеваниями, амилоидоз, связанный с миеломой или макроглобулинемией, амилоидоз, связанный с иммуноцитарной дискразией, моноклональной гаммапатией, оккультной дискразией и локальный нодулярный амилоидоз, связанный с хроническими воспалительными заболеваниями.

Раскрытые способы лечения и профилактики являются полезными для лечения людей.

Типичные показатели эффективности терапевтического лечения включают замедление прогрессирования амилоидоза, торможение образования депо амилоидных фибриллярных агрегатов и/или устранение амилоидных фибриллярных агрегатов. Типичные показатели эффективного профилактического

лечения включают задержку начала развития амилоидоза и/или снижение риска развития амилоидоза.

В дополнение к указанному, изобретение относится к способам обнаружения амилоидного депо, связанного с амилоидозом АА-типа у субъекта-человека, с использованием гуманизированного или химерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 человеческого А-амилоидного пептида, и указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с детектируемой меткой, и затем у субъекта проводят детекцию детектируемой метки. Дополнительные способы включают обнаружение агрегированного амилоидного белка, содержащего аминокислотные последовательности ED, путем использования антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, где  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами. Вышеуказанные способы обнаружения можно применять, например, для контроля начала или прогрессирования болезни или для лечения любого из вышеупомянутых заболеваний и нарушений. В отношении раскрытых в настоящем изобретении способов лечения такой контроль можно осуществлять у людей, а также у субъектов, отличных от людей. Полезные детектируемые метки включают радиометки, например  $^{125}I$ . При осуществлении таких способов детекции этап обнаружения детектируемой метки можно проводить неинвазивными способами, например получением изображения с помощью мультифункциональной томографической системы СPECT/СТ и ядерно-магнитной (ЯМР) спектроскопии.

В дополнение к указанному способу рассматриваются способы активной иммунотерапии у субъекта с амилоидозом АА-типа путем применения средства, которое индуцирует иммунный ответ к остаткам 70-76 из А-амилоидного пептида, который обладает эффектом индуцирования иммунного ответа и содержит антитела против остатков 70-76 из А-амилоидного пептида. Типичные средства, индуцирующие иммунный ответ, включают остатки 70-76 из А-амилоидных пептидов или субфрагмент по меньшей мере из трех смежных остатков, имеющих менее 20 смежных аминокислот из АА-пептида. Эти способы полезны с терапевтической и профилактической стороны для лечения вышеописанных субъектов, в отношении пассивной иммунотерапии, т.е. путем введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с остатками 70-76 А-амилоидного пептида. Показатели терапевтической и профилактической эффективности в отношении пассивной иммунотерапии аналогичны указанным выше.

Вышеизложенное суммирует конкретные аспекты по настоящему изобретению, и далее описаны его дополнительные аспекты.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Выравнивание последовательностей человеческого белка SAA1, человеческого SAA2, человеческого SAA3 и человеческого SAA4.

Фиг. 2: Выравнивание последовательностей человеческого SAA1 и человеческого AA1.

Фиг. 3: Выравнивание последовательностей человеческого SAA2 и человеческого AA2.

Фиг. 4: Выравнивание последовательностей человеческого SAA3 и человеческого AA3.

Фиг. 5: Выравнивание последовательностей человеческого SAA4 и человеческого AA4.

Фиг. 6: Выравнивание последовательностей человеческого AA1, человеческого AA2, человеческого AA3 и человеческого AA4.

Фиг. 7: Выравнивание последовательностей последних семи остатков человеческого AA1, человеческого AA2, человеческого AA3 и человеческого AA4.

Фиг. 8: Выравнивание последовательностей мышинового SAA1, мышинового SAA2, мышинового SAA3 и мышинового SAA4.

Фиг. 9: Выравнивание последовательностей мышинового SAA1 и мышинового AA1.

Фиг. 10: Выравнивание последовательностей мышинового SAA2 и мышинового AA2.

Фиг. 11: Выравнивание последовательностей мышинового SAA3 и мышинового AA3.

Фиг. 12: Выравнивание последовательностей мышинового SAA4 и мышинового AA4.

Фиг. 13: Выравнивание последовательностей мышинового AA1, мышинового AA2, мышинового AA3 и мышинового AA4.

Фиг. 14: Выравнивание последовательностей последних семи остатков мышинового AA1, мышинового AA2, мышинового AA3 и мышинового AA4.

Фиг. 15: Выравнивание последовательностей человеческого SAA1 и мышинового SAA1.

Фиг. 16: Выравнивание последовательностей человеческого AA1 и мышинового AA1.

Фиг. 17: Выравнивание последовательностей человеческого SAA1 и фрагмента мышинового SAA1.

Фиг. 18: Выравнивание последовательностей человеческого SAA1-альфа, человеческого SAA1-бета и человеческого SAA1-гамма.

Фиг. 19: Выравнивание последовательностей человеческого SAA2-альфа и человеческого SAA2-бета.

Фиг. 20: Сравнение последовательностей белков SAA. Область пептида, обычно продуцирующая 2A4, 8G9 и 7D8, показана пунктирными линиями. Вставки из 8 аминокислот между положениями 67 и 68 в последовательности шарпея подчеркнуты и обозначены стрелкой. Выравнивание проводили с CLUSTALW.

Фиг. 21: Зародышевая последовательность легкой цепи V $\kappa$ .

Фиг. 22: Зародышевая последовательность легкой цепи V $\lambda$ .

Фиг. 23: Аминокислотная последовательность V $\lambda$ 6 Wil.

Фиг. 24: Рентгенокристаллография V $\lambda$ 6 Wil, показывающая положение Glu50-Asp51.

Фиг. 25: Рентгенокристаллография V $\lambda$ 6 Wil, показывающая положение Glu81-Asp82.

Фиг. 26: Кинетика связывания моноклональных антител mAb Elan с синтетическими фибриллами V $\lambda$ 6 Wil. Измерения взаимодействия mAb 2A4, 7D8 и 8G9 в концентрации 6,6 нМ с иммобилизованными фибриллами V $\lambda$ 6 Wil с помощью биосенсора BIAcore. Расчетная константа KD каждого взаимодействия составляла около 1 нМ.

Фиг. 27: Кинетика связывания в зависимости от концентрации mAb 7D8 с синтетическими фибриллами V $\lambda$ 6 Wil. Взаимодействие антитела в концентрации 6,6-33,3 нМ с иммобилизованными фибриллами V $\lambda$ 6 Wil измеряли с помощью BIAcore.

Фиг. 28: Кинетика связывания mAb 7D8 с синтетическими фибриллами V $\lambda$ 6 Wil в присутствии пептидов p39 и p41. Взаимодействие mAb 7D8 в концентрации 6,6 нМ с иммобилизованными фибриллами V $\lambda$ 6 Wil измеряли с помощью BIAcore в присутствии пептидов p39 и p41 в концентрации 1 или 20 мкг/мл.

Фиг. 29: Реактивность моноклональных антител с тканевыми амилоидными депо ALA.

Фиг. 30: Биораспределение меченого <sup>125</sup>I mAb 7D8 у мышей, несущих человеческую амилоидому ALA.

Фиг. 31: Взаимодействие анти-АА из культурального супернатанта с АА-фибриллами мышино происхождения. Показатели связывания с мышинным фактором усиления амилоидоза (AEF) АА-типа моноклонального антитела mAb из культурального супернатанта. На верхней и нижней схеме представлены данные, соответственно, по первому и второму сбору культуральной жидкости.

Фиг. 32: Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия SDS-PAGE белка-А, очищенного моноклональными антителами 2A4, 8G9 и 7D8.

Фиг. 33: Связывание очищенных mAb с иммунизирующим (p#39) и контрольным пептидом (p#41).

Фиг. 34: Связывание с мышинным амилоидным экстрактом АА-типа (AEF).

Фиг. 35: Связывание очищенных mAb с амилоидным экстрактом АА-типа почек человека.

Фиг. 36А-36Е: Мышинные последовательности переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи 2A4, 7D8 и 8G9 (фиг. 36А); последовательности переменных областей легкой цепи гуманизированного 2A4/8G9 и 7D8 (фиг. 36В-36С); человеческие последовательности переменных областей легкой цепи, используемые в качестве акцепторных каркасов (фиг. 36D); последовательности переменных областей тяжелой цепи гуманизированных 2A4/7D8/8G9 и человеческой переменной области тяжелой цепи, используемые в качестве акцепторного каркаса (фиг. 36Е).

Подчеркивание - CDR; двойное подчеркивание - лидерные последовательности; нижний регистр - обратные мутации.

### Подробное описание изобретения

Изобретение относится к выделенному антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом, включающим X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> в агрегированном амилоидном белке, где X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> являются любыми аминокислотами.

Типичные антитела по изобретению также включают антитела или их фрагменты, которые (а) конкурируют до связывания с эпитопом, включающим X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, с антителами 2A4, 7D8 или 8G9; (б) связываются с тем же эпитопом, включающим X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, что и антитела 2A4, 7D8 или 8G9; (с) включают антигенсвязывающий домен из антител 2A4, 7D8 или 8G9 или (д) включают шесть участков, определяющих комплементарность (CDR), из антител 2A4, 7D8 или 8G9.

Изобретение также относится к выделенной переменной области антитела, которая включает (а) переменную область легкой цепи антитела, полученного из 2A4, 7D8, или 8G9 антитело; или (б) переменную область тяжелой цепи антитела, происходящего из антител 2A4, 7D8 или 8G9.

Изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи антитела, которая включает (а) нуклеотидную последовательность, которая кодирует переменную область легкой цепи или тяжелой цепи антител 7D8, 2A4 или 8G9; (б) нуклеотидную последовательность, которая идентична нуклеотидной последовательности антител 7D8, 2A4 или 8G9, которая кодирует переменную область легкой цепи или тяжелой цепи; (с) нуклеотидную последовательность, которая по существу идентична нуклеотидной последовательности (а) или (б); или (д) нуклеиновую кислоту, которая специфически гибридизуется с нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности (а) или (б) при строгих условиях гибридизации.

Также в настоящем изобретении рассматриваются клетки, экспрессирующие антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Изобретение дополнительно относится к клеткам, экспрессирующим нуклеиновые кислоты по изобретению.

Изобретение также включает способы лечения амилоидных заболеваний и способы профилактики амилоидных заболеваний путем применения антител и антигенсвязывающих фрагментов по изобре-

нию. В настоящее время не существует каких-либо одобренных амилоид-специфических способов лечения какого-либо из амилоидных заболеваний, включающих амилоидоз AA-типа и амилоидоз AL-типа. См. Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001). При наличии основного или сопутствующего заболевания терапия направлена на уменьшение выработки амилоидогенного белка путем лечения основного заболевания. Например, современная стратегия лечения амилоидоза AA-типа нацелена на основной воспалительный процесс путем уменьшения уровня белка АроSSA ниже 10 мг/л. Применяемые в настоящее время способы лечения включают химиотерапию (хлорамбуцил и метотрексат MTX), иммунодепрессанты (азатиоприн), противовоспалительные лекарства (колхицин) и ингибиторы TNF. Изобретение относится к фармацевтическим композициям и способам лечения ряда амилоидных заболеваний, включающих амилоидоз, такой как, например, амилоидоз AA-типа и амилоидоз AL-типа. Согласно одному аспекту изобретение включает фармацевтические композиции, которые в качестве активного компонента включают средство, обладающее действием индуцирования иммунного ответа против амилоидного компонента у пациента. Средство может быть пептидом, содержащим фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности  $X_1EDX_2$ , полученной из амилоидного белка. Средство может представлять собой антитело, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$ . В других вариантах осуществления средство может являться антигенсвязывающим фрагментом антитела. Такие композиции будут также обычно включать наполнители и в предпочтительных вариантах осуществления могут включать адъюванты. В дополнительно предпочтительных вариантах осуществления адъюванты включают, например, гидроокись алюминия, фосфат алюминия, монофосфорил-липид MPL™, QS-21 (STIMULON™) или неполный адъювант Фрейнда. Согласно родственному варианту осуществления указанные фармацевтические композиции могут включать множество средств, обладающих действием активации иммунного ответа у пациента на более чем один амилоидный компонент.

В родственном варианте осуществления средство обладает действием активации иммунного ответа, направленного против агрегированного амилоидного белка, такого как фибриллярный пептид или компонент амилоидного белка. Предпочтительно указанный фибриллярный пептид или белок происходит из фибриллярного белка-предшественника, который достоверно связан с определенными формами амилоидных заболеваний согласно описанию изобретения. Такие белки-предшественники включают без ограничения сывороточный А-амилоидный белок (АроSSA), легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, АроA1, транстиретин, лизозим, цепь фиброгена  $\alpha$ , гельсолин, цистатин С, белок-предшественник  $\beta$ -амилоида ( $\beta$ -APP), бета<sub>2</sub>-микроглобулин, белок-предшественник приона (PrP), атриальный натрийуретический фактор, кератин, островковый амилоидный полипептид, пептидный гормон и синуклеин. Такие предшественники также включают мутантные белки, фрагменты белков и протеолитические пептиды указанных предшественников. В предпочтительном варианте осуществления средство обладает действием активации иммунного ответа, направленного против неозпитопа, образованного фибриллярным белком или пептидом, относительно фибриллярного белка-предшественника. Таким образом, как описано более подробно в настоящем изобретении, многие фибрилл-образующие пептиды или белки представляют собой фрагменты таких белков-предшественников, например вышеупомянутых белков-предшественников. При образовании указанных фрагментов, например, путем протеолитического расщепления могут быть обнаружены эпитопы, которые не присутствуют у предшественника и поэтому иммунологически не доступны для иммунной системы, если фрагмент является частью белка-предшественника. Средства, нацеленные на такие эпитопы, могут быть предпочтительными терапевтическими средствами, так как они с меньшей вероятностью могут вызывать аутоиммунную реакцию у пациента. Предпочтительно такие средства вызывают иммунный ответ, направленный на патологическую форму амилоидного белка, в первую очередь, например, на агрегированный амилоидный белок, относительно непатологических форм амилоидного белка.

Согласно родственному варианту осуществления фармацевтические композиции по изобретению включают вещества, нацеленные на амилоидные агрегаты, например вещества, выбранные из группы, которые включают без ограничения следующие агрегированные (например, фибриллярные) пептиды или белки: AA, AL, ATTR, ААроA1, Alys, Agel, Acys, A $\beta$ , AB<sub>2</sub>M, AScr, Acal, AIAPP и фрагмент синуклеин-НАС. В настоящем изобретении описаны полные наименования и композиции указанных пептидов. Такие пептиды можно изготавливать в соответствии с известными в данной области техники способами согласно описанию по настоящему изобретению.

Способы содержат введение пациенту эффективной дозы антитела, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в амилоидном белке, где  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P, A или любой другой аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий ED в указанном амилоидном белке; и в котором  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, A или любой другой аминокислотный остаток, расположенный непосредственно после ED в таком амилоидном белке. Согласно некоторым способам пациент страдает амилоидозом, связанным с агрегированным амилоидным белком, содержащим аминокислотные последовательности ED. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, состоящим из указанного  $X_1EDX_2$ . В некоторых антителах  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P или A и  $X_2$  является T, S, E, D, R, I, V, F или A. В некоторых таких антителах, если  $X_1$  является H, то  $X_2$  пред-



ставляет собой Т или А; если  $X_1$  является А, то  $X_2$  представляет собой S, Т, Е или V; если  $X_1$  является Т, то  $X_2$  представляет собой Е; если  $X_1$  является F, то  $X_2$  является D; если  $X_1$  является S, то  $X_2$  представляет собой Е, F или А; и если  $X_1$  является Р, то  $X_2$  представляет собой Е, I или F. В некоторых антителах  $X_1$  представляет собой H, Т, F, S, Р или А и  $X_2$  представляет собой Т, S, E, D, R, I, V, F или А при условии, что если  $X_1$  является А, то  $X_2$  не является V. В некоторых антителах, если  $X_1$  является А, то  $X_2$  представляет собой S, Т или Е.

Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), SEDF (SEQ ID NO: 24) и SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 из AA. Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 71-75 из AA.

Некоторые антитела индуцированы к пептиду, содержащему GHEDT (SEQ ID NO: 3).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотные последовательности PEDS (SEQ ID NO: 26), PEDL (SEQ ID NO: 27), TEDV, (SEQ ID NO: 28), AEDE (SEQ ID NO: 19), SEDI (SEQ ID NO: 29) и TEDT (SEQ ID NO: 30).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотные последовательности LEDG (SEQ ID NO: 31), AEDM (SEQ ID NO: 32), HEDS (SEQ ID NO: 33), CEDD (SEQ ID NO: 34), QEDS (SEQ ID NO: 35), REDS (SEQ ID NO: 36), TEDG (SEQ ID NO: 37), QEDR (SEQ ID NO: 38), TEDL (SEQ ID NO: 39), PEDN (SEQ ID NO: 40), EEDP (SEQ ID NO: 41), LEDL (SEQ ID NO: 42), KEDA (SEQ ID NO: 43), SEDC (SEQ ID NO: 44), EEDD (SEQ ID NO: 45), SEDK (SEQ ID NO: 46), DEDD (SEQ ID NO: 47), DEDG (SEQ ID NO: 48), LEDE (SEQ ID NO: 49), GEDA (SEQ ID NO: 50), VEDF (SEQ ID NO: 51), YEDE (SEQ ID NO: 52), IEDL (SEQ ID NO: 53), WEDY (SEQ ID NO: 54), DEDW (SEQ ID NO: 55), SEDL (SEQ ID NO: 56), YEDQ (SEQ ID NO: 57), LEDW (SEQ ID NO: 58), YEDR (SEQ ID NO: 59) и PEDK (SEQ ID NO: 60).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность AEDV (SEQ ID NO: 23). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEDF (SEQ ID NO: 24) или PEDF (SEQ ID NO: 22). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность AEDS (SEQ ID NO: 13). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность PEDI (SEQ ID NO: 21), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24), SEDA (SEQ ID NO: 25), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19) и PEDE (SEQ ID NO: 20). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность TEDE (SEQ ID NO: 16). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность AEDV (SEQ ID NO: 23). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEDF (SEQ ID NO: 24) или PEDF (SEQ ID NO: 22). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность AEDS (SEQ ID NO: 13). Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность PEDI (SEQ ID NO: 21), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24), SEDA (SEQ ID NO: 25), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19) и PEDE (SEQ ID NO: 20). Некоторые антитела связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность TEDE (SEQ ID NO: 16).

Любое из вышеописанных антител можно вводить описанными выше способами для осуществления лечения или профилактики заболевания, характеризующегося накоплением амилоидного белка, например амилоидного белка, содержащего аминокислотную последовательность ED. В некоторых способах для лечения или профилактики болезни Альцгеймера или умеренного когнитивного нарушения не вводят антитело, если амилоидный белок содержит аминокислотную последовательность AEDV (SEQ ID NO: 23). Амилоидный белок может представлять собой что-либо из нижеперечисленного: сывороточный А-амилоидный белок, белок легкой цепи иммуноглобулина, такой как, например, V $\lambda$ 6 Wil или V $\kappa$ , человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR) или ApoA1.

Необязательно, пациент является человеком. Необязательно, антитело специфически связывается с пептидом, остатки которого состоят из последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11. Необязательно, антитело специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из (SEQ ID NO: 2). Необязательно, антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. Необязательно, человеческое антитело представляет собой изотип человеческого IgG1, IgG4, IgG2 или IgG3. Необязательно, гуманизированное антитело является изотипом человеческого IgG1, IgG4, IgG2 или IgG3. Необязательно, химерное антитело представляет собой изотип человеческого IgG1, IgG4, IgG2 или IgG3. Необязательно, антитело является мышинным антителом.

Необязательно, антитело является поликлональным антителом. Необязательно, антитело является моноклональным антителом.

В некоторых способах лечения антитело содержит две копии одной и той же пары легких и тяжелых цепей. В других способах антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую пару легкой и тяжелой цепей, которая специфически связывается с эпитопом Aβ, и вторую пару легкой и тяжелой цепей, которая специфически связывается с Fc-рецептором на микроглиальных клетках. Согласно другим способам осуществляют слияние цепи антитела с гетерологичным полипептидом.

Согласно некоторым способам лечения доза антитела составляет по меньшей мере 1 мг/кг массы тела пациента. По другим способам доза антитела составляет по меньшей мере 10 мг/кг массы тела пациента.

Согласно некоторым способам лечения антитело вводят с носителем в виде фармацевтической композиции. По другим способам антитело представляет собой человеческое антитело к АА, приготовленное из В-клеток человека, иммунизированного пептидом АА. Необязательно, человек, иммунизированный пептидом АА, является больным. По некоторым способам антитело вводят интраперитонеально, перорально, интраназально, подкожно, внутримышечно, местно или внутривенно.

Согласно некоторым способам лечения антитело вводят посредством введения пациенту полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере одну цепь антитела, и экспрессия полинуклеотида направлена на продукцию цепи антитела у пациента. Необязательно, полинуклеотид кодирует тяжелые и легкие цепи антитела, и полинуклеотид экспрессируется для продукции тяжелых и легких цепей у пациента.

Некоторые из вышеупомянутых способов лечения дополнительно содержат введение эффективной дозы по меньшей мере одного другого антитела, которое связывается с другим эпитопом АА. Некоторые из вышеупомянутых способов лечения дополнительно содержат контроль уровня вводимого пациенту антитела в крови пациента. В других способах антитело вводят в многократной дозе в течение по меньшей мере шести месяцев. В других способах антитело вводят в виде композиции с длительным высвобождением.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам осуществления профилактики амилоидоза АА-типа у пациента, предрасположенного к развитию амилоидоза АА-типа. Указанные способы содержат введение пациенту эффективной дозы антитела, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из АА. Необязательно, пациент является человеком. Необязательно, антитело специфически связывается с пептидом, остатки которого состоят из последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11. Необязательно, антитело специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из (SEQ ID NO: 2). В некоторых способах основное заболевание пациента является амилоидным заболеванием, которое выбрано из группы, состоящей из следующих патологий: ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочеполового тракта, базальноклеточная карцинома, волосатоклеточный лейкоз, семейная средиземноморская лихорадка и болезнь Кастлемана.

Изобретение дополнительно рассматривает человеческое, гуманизированное или химерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из АА. Необязательно, гуманизированное антитело специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из АА.

Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 7D8. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 7D29. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 7D19. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 7D47. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 7D39. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 7D66. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 8G9. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 8G3. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 8G4. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 8G51. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 8G22. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антите-

ло версии 8G30. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 8G46. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 2A4. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 2A20. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 2A44. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 2A77. Необязательно, гуманизированное антитело является гуманизированным антителом версии 2A13. Необязательно, гуманизированное антитело представляет собой гуманизированное антитело версии 2A14.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям. Фармацевтические композиции содержат антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из AA, и фармацевтически приемлемый носитель. Некоторые фармацевтические композиции содержат человеческое, гуманизированное или химерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из AA, и фармацевтически приемлемый носитель. Другие фармацевтические композиции содержат антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 70-76 из AA, и фармацевтически приемлемый носитель, в которых изотипом антитела является человеческий IgG1 и носитель является фармацевтически приемлемым. В некоторых фармацевтических композициях изотип антитела представляет собой человеческие IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых фармацевтических композициях антитело является человеческим. В некоторых фармацевтических композициях антитело является гуманизированным. В некоторых фармацевтических композициях антитело является химерным. В некоторых фармацевтических композициях антитело представляет собой поликлональное антитело. В некоторых фармацевтических композициях антитело является моноклональным антителом.

В некоторых фармацевтических композициях антитело содержит две копии одной и той же пары легких и тяжелых цепей. В некоторых фармацевтических композициях антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую пару легкой и тяжелой цепей, которая специфически связывается с эпитопом AA, и вторую пару легкой и тяжелой цепей, которая специфически связывается с Fc-рецептором на микроглиальных клетках. Некоторые фармацевтические композиции имеют цепи антитела, слитые с гетерологичным полипептидом.

В некоторых фармацевтических композициях носитель представляет собой физиологически приемлемый разбавитель для парентерального введения. Некоторые фармацевтические композиции адаптированы для интраперитонеального, перорального, интраназального, подкожного, внутримышечного, местного или внутривенного введения. Некоторые фармацевтические композиции приспособлены для введения в многократной дозе в течение по меньшей мере шести месяцев. Некоторые фармацевтические композиции приспособлены для введения в виде композиции с длительным высвобождением. Некоторые фармацевтические композиции дополнительно содержат по меньшей мере одно другое антитело, которое связывается с другим эпитопом AA.

Настоящее изобретение относится к способам лечения амилоидоза AA-типа у пациента. Эти способы включают введение средства, индуцирующего иммунный ответ на AA70-76, по схеме, эффективной для вызова иммунного ответа, и указанное средство содержит антитела против AA70-76 по схеме, эффективной для вызова иммунного ответа, содержащей антитела против AA70-76. В некоторых способах пациент является человеком. Необязательно, средство содержит остатки 70-76 из пептида AA или субфрагмент по меньшей мере из его трех смежных остатков и имеет менее 20 смежных аминокислот из AA. Необязательно, средство является пептидом, имеющим аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11, и субфрагменты по меньшей мере из трех смежных остатков указанных последовательностей, и имеет менее 20 аминокислот из пептида AA. Необязательно, средство соединено с первым и вторым гетерологичными полипептидами на N-конце и C-конце. Необязательно, средство соединено на N-конце с гетерологичным полипептидом и на C-конце по меньшей мере с одной дополнительной копией N-концевого сегмента. В некоторых способах гетерологичный полипептид индуцирует T-клеточный ответ против гетерологичного полипептида и, таким образом, B-клеточный ответ против AA. В некоторых способах полипептид дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную копию AA. Необязательно, полипептид содержит AA от N-конца к C-концу, множество дополнительных копий AA и гетерологичный аминокислотный сегмент.

Согласно некоторым способам лечения полипептид вводят с адъювантом, который усиливает иммунный ответ на N-концевой сегмент. Необязательно, адъювант и полипептид вводят вместе в виде композиции. Необязательно, адъювант вводят перед полипептидом. Необязательно, адъювант вводят после полипептида. В некоторых способах адъювантом являются квасцы. В некоторых способах адъювантом является монфосфорил-липид MPL. В некоторых способах адъювантом является QS-21. В некоторых способах адъювант представляет собой неполный адъювант Фрейнда. В некоторых способах иммунная реакция содержит T-клетки, которые связываются с AA-пептидом в качестве компонента главных комплексов гистосовместимости MHC I или MHC II.

Настоящее изобретение относится к способам осуществления профилактики амилоидоза AA у пациента. Указанные способы включают введение средства, которое вызывает иммунный ответ на AA70-76

по схеме, эффективной для индукции иммунного ответа, и указанное средство содержит антитела против AA70-76 по схеме, эффективной для индукции иммунного ответа, содержащей антитела против AA70-76. Согласно некоторым способам пациент является человеком. По некоторым способам у пациента отсутствует симптоматика. По некоторым способам основным заболеванием пациента является амилоидное заболевание, которое выбрано из группы, состоящей из следующего: ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочевого тракта, базальноклеточная карцинома, волосатоклеточный лейкоз, семейная средиземноморская лихорадка и болезнь Кастлемана.

Согласно некоторым способам осуществления профилактики средство содержит AA70-76 или субфрагмент по меньшей мере из его трех смежных остатков и имеет менее 20 смежных аминокислот из пептида AA. Необязательно, средством является пептид, имеющий аминокислотную последовательность из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11, и субфрагменты по меньшей мере из трех смежных остатков этих последовательностей, и имеет менее 20 аминокислот из пептида AA. Необязательно, средство соединено с первым и вторым гетерологичным полипептидом на N-конце и C-конце. Необязательно, средство соединено на N-конце с гетерологичным полипептидом и на C-конце по меньшей мере с одной дополнительной копией N-концевого сегмента. В ряде способов гетерологичный полипептид индуцирует T-клеточный ответ против гетерологичного полипептида и, таким образом, B-клеточный ответ против AA. В некоторых способах полипептид дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную копию AA. Необязательно, полипептид содержит AA от N-конца к C-концу, множество дополнительных копий AA и гетерологичный аминокислотный сегмент.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям. Фармацевтические композиции содержат AA-фрагмент, состоящий из остатков, начиная с остатка 70 из AA и заканчивая остатком 76 из AA. Необязательно, фрагмент AA соединен на C-конце с гетерологичным полипептидом. Необязательно, AA-фрагмент соединен на N-конце с гетерологичным полипептидом. Необязательно, AA-фрагмент соединен на N-конце и C-конце с первым и вторым гетерологичными полипептидами. Необязательно, фрагмент AA связан на N-конце с гетерологичным полипептидом и на C-конце по меньшей мере с одной дополнительной копией N-концевого сегмента. Необязательно, полипептид дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную копию N-концевого сегмента. Необязательно, полипептид содержит AA от N-конца к C-концу, множество дополнительных копий AA и гетерологичный аминокислотный сегмент. В некоторых фармацевтических композициях гетерологичный полипептид индуцирует T-клеточный ответ против гетерологичного полипептида и, таким образом, B-клеточный ответ против N-концевого сегмента.

Некоторые фармацевтические композиции дополнительно содержат адъювант, который усиливает иммунный ответ на AA. В некоторых способах адъювантом являются квасцы. В некоторых способах адъювантом является MPL. В некоторых способах адъювантом является QS-21. В некоторых способах адъювант представляет собой неполный адъювант Фрейнда. Необязательно, адъювант дополнительно содержит гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор GM-CSF. Необязательно, адъювантом является макрофаго-колониестимулирующий фактор M-CSF.

Необязательно, композиция содержит более 10 мкг полипептида.

Настоящее изобретение относится к способам лечения амилоидоза AA-типа у пациента. Способы содержат введение средства, эффективно индуцирующего иммунную реакцию против пептидного компонента амилоидного депо у пациента, и введение другого средства, который лечит основное заболевание, и таким образом осуществляется лечение амилоидоза AA-типа у пациента. В некоторых способах основное заболевание выбирают из группы, состоящей из следующих патологий: ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочевого тракта, базальноклеточная карцинома, волосатоклеточный лейкоз, семейная средиземноморская лихорадка и болезнь Кастлемана.

Настоящее изобретение относится к способам осуществления профилактики амилоидоза AA-типа у пациента. Способы содержат введение средства, обладающего действием индуцирования иммунной реакции против пептидного компонента амилоидного депо у пациента, и другого средства, которое лечит основное заболевание, и таким образом проводят лечение амилоидоза AA-типа у пациента. В некоторых способах основное заболевание выбирают из группы, состоящей из следующих патологий: ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочевого тракта.

го тракта, базальноклеточная карцинома, волосатоклеточный лейкоз, семейная средиземноморская лихорадка и болезнь Кастлемана.

Настоящее изобретение относится к способам скрининга антител на активность для лечения пациента, страдающего амилоидозом АА-типа. Указанные способы содержат контакт антитела с АА-пептидом и определение специфического связывания антитела с АА, при этом специфическое связывание является показателем активности антитела в лечении амилоидоза АА-типа.

Настоящее изобретение относится к способам скрининга антител на активность удаления биологических единиц, физически связанных с антигеном. Способы содержат объединение связанной с антигеном биологической единицы, антитела и клеток-фагоцитов, имеющих в среде Fc-рецепторы; и контроль количества связанных с антигеном биологических единиц, остающихся в среде, при этом уменьшение количества связанных с антигеном биологических единиц указывает на наличие активности антитела по удалению антигена. В некоторых способах на этапе контроля отслеживается количество антигена, остающегося в среде. В некоторых способах объединение содержит добавление связанной с антигеном биологической единицы к среде, и контакт среды с клетками-фагоцитами, несущими Fc-рецепторы. Согласно некоторым способам связанная с антигеном биологическая единица представляет собой образец ткани. В некоторых способах антигеном является биологическая единица. В некоторых способах образец ткани содержит амилоидное депо. Необязательно, образец ткани забирается у пациента или млекопитающего, страдающего амилоидозом АА-типа. В некоторых способах антигеном является АА. В некоторых способах клетки-фагоциты представляют собой макроглиальные клетки. В некоторых способах образец ткани выбирают из группы, состоящей из образца злокачественной ткани, образца инфицированной вирусом ткани, образца ткани, содержащего воспалительные клетки, образца с доброкачественным аномальным клеточным ростом и образца ткани, содержащего аномальный внеклеточный матрикс.

Изобретение относится к способам обнаружения амилоидного депо у пациента. Указанные способы содержат введение пациенту антитела, которое специфически связывается с эпитопом в АА в пределах от 70 до 76 аминокислот, и детекцию присутствия антитела у пациента. Необязательно, антитело является меченым. Необязательно, антитело имеет парамагнитную метку.

Необязательно, меченое антитело обнаруживают с помощью ядерно-магнитного резонанса. Необязательно, меченое антитело обнаруживают получением отображения с помощью СРЕСТ/СТ. В некоторых способах антитело не способно вызывать у пациента реакцию элиминации при связывании с амилоидным депо.

Настоящее изобретение относится к диагностическим комплектам. Комплекты содержат антитело, которое специфически связывается с эпитопом с остатками 70-76 из АА. Некоторые комплекты дополнительно содержат маркировку, описывающую применение антитела *in vivo* у пациента для диагностики или контроля болезни, связанной с амилоидными депо АА-типа. В некоторых вариантах осуществления комплекты содержат инструкции по применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для обнаружения АА.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу диагностики амилоидоза у субъекта, содержащему (а) введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связаны с меткой обнаружения, и специфическое связывание указанного антитела или его фрагмента с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами; и (б) обнаружение присутствия или отсутствия связанного антитела или его фрагмента, при этом присутствие связанного антитела или его фрагмента указывает на диагноз амилоидоза АА-типа.

Дополнительно, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики амилоидоза с применением антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$ , в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами. Например,  $X_1$  содержит Н, Т, F, S, Р, А, L, С, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I или W, например Н, Т, F, S, Р или А или, например, Н, Т, F или А.  $X_2$  содержит Т, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y или Q, такие как Т, S, E, R, I, V, F, D или А, или, например, Т, S, E, D или А. В других примерах  $X_1$  представляет собой Н, Т или А и  $X_2$  представляет собой Т, S, E или А, например  $X_1$  является Н или А и  $X_2$  представляет собой Т, S или А. В еще одном примере  $X_1$  является Н и  $H_2$  представляет собой Т или А; или  $X_1$  представляет собой А и  $X_2$  является S, Т, E или V, например  $X_1$  является А и  $X_2$  является S, Т или E, или  $X_1$  представляет собой Т и  $X_2$  является E, или  $X_1$  является F и  $X_2$  является D, или  $X_1$  является S и  $X_2$  является E, F или А; или  $X_1$  является Р и  $X_2$  представляет собой E, I или F.

В частности, эпитопы включают аминокислотные последовательности, такие как указанные последовательности от SEQ ID NO: 3 до SEQ ID NO: 25, например SEQ ID NO: 3, 12, 13, 14, 15 и 16.

Дополнительные примеры содержат SEQ ID NO: 4, 5, 7, 8 и 9, например SEQ ID NO: 4. Антитела по изобретению, которые связываются с эпитопами, например с SEQ ID NO: 3, включают антитела 2A4, 7D8 и 8G9.

Агрегированные амилоидные белки, с которыми связываются антитела изобретения, представляют собой немномерные белки. Такие агрегированные амилоидные белки включают сывороточный А-амилоидный белок (SAA), белок легкой цепи иммуноглобулина, человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR) и ApoA1, такой как SAA.

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые (а) конкурируют с антителами 2A4, 7D8 или 8G9 за связывание с эпитопом, который включает  $X_1EDX_2$ ; (б) связываются с тем же эпитопом, который включает  $X_1EDX_2$ , что и антитела 2A4, 7D8 или 8G9; (в) имеют антигенсвязывающий домен из антител 2A4, 7D8 или 8G9 или (д) включают шесть участков, определяющих комплементарность (CDR) из антител 2A4, 7D8 или 8G9. Изобретение также относится к химерным или гуманизированным версиям антител 2A4, 7D8 или 8G9.

Типичные антитела, которые специфически связываются с эпитопом, включающим  $X_1EDX_2$ , также включают антитела, имеющие по меньшей мере один, два или три из участков, определяющих комплементарность (CDR) в легкой цепи антител 2A4, 7D8 или 8G9. Антитела по изобретению, которые специфически связываются с эпитопом, включающим  $X_1EDX_2$ , также включают антитела, имеющие по меньшей мере один, два или три участка CDR из тяжелой цепи антител 2A4, 7D8 или 8G9.

Участки CDR можно идентифицировать согласно способам, известным в данной области техники. Например, общепринятыми являются системы нумерации для распознавания участков CDR. Определение по Kabat основано на вариабельности последовательностей, и определение по Chothia основано на местоположении структурных петлевых участков. Определение AbM представляет собой компромисс между подходами по Kabat и Chothia. Участки CDR вариабельной области легкой цепи соединены посредством остатков в положениях 24 и 34 (CDR1-L), 50 и 56 (CDR2-L) и 89 и 97 (CDR3-L) согласно алгоритмам по Kabat, Chothia или AbM. Согласно определению Kabat участки CDR вариабельной области тяжелой цепи соединены посредством остатков в положениях 31 и 35B (CDR1-H), 50 и 65 (CDR2-H) и 95 и 102 (CDR3-H) (соглашение о нумерации по Kabat). Согласно определению Chothia участки CDR вариабельной области тяжелой цепи соединены посредством остатков в положениях 26 и 32 (CDR1-H), 52 и 56 (CDR2-H) и 95 и 102 (CDR3-H) (соглашение о нумерации по Chothia). Согласно определению AbM, участки CDR вариабельной области тяжелой цепи соединены посредством остатков в положениях 26 и 35B (CDR1-H), 50 и 58 (CDR2-H) и 95 и 102 (CDR3-H) (соглашение о нумерации по Kabat). См. публикации: Martin et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272; Martin et al. (1991), Methods Enzymol. 203:121-153; Pedersen et al. (1992), Immunomethods, 1:126 и Rees et al. (1996) в издании Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, p. 141-172.

Антитела по изобретению дополнительно включают антитело, которое специфически связывается с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$ , в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  являются любыми аминокислотами, имеющими вариабельные области, происходящие из вариабельных областей антител 2A4, 7D8 или 8G9. Антитела, имеющие вариабельные области антител 2A4, 7D8 или 8G9, также включены в изобретение.

Антитела по изобретению дополнительно включают химерные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, однопочечные антитела, тетрамерные антитела, тетравалентные антитела, мультиспецифичные антитела, домен-специфичные антитела, домен-делетированные антитела или слитые белки.

Фрагменты антител по изобретению также относятся к настоящему изобретению. Фрагменты по изобретению могут быть фрагментами участков связывания антигена Fab, Fab'-фрагментами, F(ab')<sub>2</sub>-фрагментами, Fv-фрагментами или ScFv-фрагментами. Такие антитела или их фрагменты могут функционировать в паре с цитостатическим средством, радиотерапевтическим средством или с детектируемой меткой.

Настоящее изобретение также относится к вариабельной области выделенного антитела, содержащей (а) вариабельную область легкой цепи, полученную из вариабельной области легкой цепи антитела 7D8, 2A4 или 8G9, или (б) вариабельную область тяжелой цепи, полученную из вариабельной области легкой цепи антитела 7D8, 2A4 или 8G9. Также рассматриваются выделенные вариабельные области, имеющие вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи антитела 7D8, 2A4 или 8G9. Выделенные вариабельные области антитела являются полезными для получения антитела.

Изобретение также относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим вариабельные области легкой цепи антитела или вариабельные области тяжелой цепи, которые имеют (а) нуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи антитела 7D8, 2A4 или 8G9; (б) нуклеотидную последовательность, идентичную нуклеотидной последовательности антитела 7D8, 2A4 или 8G9, которая кодирует вариабельную область легкой или тяжелой цепи; или (в) нуклеотидную последовательность, которая по существу идентична, т.е. по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или на 99% идентична нуклеотидной последовательности (а) или (б); или (д) нуклеиновую кислоту, которая специфически гибридизуется с нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности (а) или (б) при строгих условиях гибридизации, например при

условии заключительного промывания 0,1 раствором хлорида и цитрата натрия SSC при 65°C.

Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам и клеточным линиям, экспрессирующим антитела или нуклеиновые кислоты по изобретению. Типичные клетки-хозяева включают клетки человека и млекопитающих, такие как клетки яичников китайских хомячков CHO, клетки почечного эмбрионального эпителия HEK-293, клетки из раковой опухоли HeLa, клетки африканской зеленой маршутки CV-1 и клетки COS. Способы получения устойчивой клеточной линии после трансформации гетерологичной конструкции в клетку-хозяина известны в данной области техники. Примеры клеток-хозяев, не относящиеся к клеткам млекопитающих, включают клетки насекомых (Potter et al. (1993), *Int. Rev. Immunol.* 10(2-3):103-112). Антитела также можно получать в трансгенных животных (Houdebine (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6):625-629) и трансгенных растениях (Schillberg et al. (2003), *Cell Mol. Life. Sci.* 60(3):433-45).

Настоящее изобретение также относится к способам осуществления лечения или профилактики амилоидоза, связанным с применением иммуногенных фрагментов амилоидного белка, содержащего  $X_1EDX_2$ , в котором  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P, A или любой другой аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий ED в таком амилоидном белке; и в котором  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, A или любой другой аминокислотный остаток, следующий сразу после ED в указанном амилоидном белке. Без намерения установить связь с конкретной теорией, считается, что эпитоп, содержащий  $X_1EDX_2$ , может становиться доступным, когда происходит агрегация амилоидных белков, или фибрилlogenез, или иным образом создается фибриллярная структура, или при расщеплении более крупного белка-предшественника, или при конформационном изменении. Например, примеры способов лечения или профилактики амилоидоза AA-типа включают введение остатков 70-76 AA или его иммуногенных фрагментов. Изобретение также относится к способам осуществления лечения или профилактики амилоидоза, связанного с накоплением амилоидного белка, с использованием антител, реагирующих с  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P, A или любой другой аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий ED в таком агрегированном амилоидном белке; и в котором  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, A или любой другой аминокислотный остаток, расположенный сразу после ED в указанном агрегированном амилоидном белке. Предпочтительно такие антитела реагируют с агрегированным амилоидным белком относительно непатологического амилоидного белка. Например, способы лечения или профилактики амилоидоза AA-типа, связанного с AA-фибриллами, могут включать введение антител, специфичных к C-концевому участку AA-фибрилл (примерно остатки 70-76 из AA). Антитела могут ингибировать образование AA-агрегатов (например, фибрилл) или вызывать их дезагрегацию и удаление, что таким образом является лечением или профилактикой амилоидоза AA-типа.

### I. Определения

Термин "по существу идентичны" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием значений веса промежутков по умолчанию имеют последовательности, идентичность которых составляет по меньшей мере 65%, предпочтительно идентичные последовательности по меньшей мере на 80 или 90%, более предпочтительны идентичные последовательности по меньшей мере на 95% или больше (например, идентичность последовательностей составляет 99% или выше). Предпочтительно положения неидентичных остатков отличаются консервативными заменами аминокислот.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как контрольная последовательность, с которой сравнивают тестовые последовательности. Используя алгоритм сравнения последовательностей, тестовые и контрольные последовательности вводят в компьютер, в случае необходимости задают координаты субпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Затем по алгоритму сравнения последовательности на основе заданных параметров программы вычисляют процент идентичности последовательностей для тестовой последовательности (последовательностей) относительно контрольной последовательности.

Можно проводить оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью поиска по методике сходства по Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), с помощью компьютерных программ выполнения указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из пакета программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison), или путем визуального наблюдения (см. в общем публикации Ausubel et al., выше). Одним из примеров алгоритмов, подходящим для определения процента идентичности последовательностей и процента сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан авторами Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST является общедоступным в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). Как правило, можно использовать параметры программы по умолчанию для проведения сравнения последовательностей, вместе с тем, можно также использовать задаваемые параметры. Программа BLASTP для аминокислотных последовательностей использует по

умолчанию длину слова (W) 3, ожидание (E) 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915 (1989)).

Для классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты разделены на группы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): норлейцин, метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): цистеин, серин, треонин; группа III (кислые боковые цепи): аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; группа IV (основные боковые цепи): аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): глицин, пролин и группа VI (ароматические боковые цепи): триптофан, тирозин, фенилаланин. Консервативные замены охватывают замены между аминокислотами одной группы. Неконсервативные замены представляют собой обмен члена одной из указанных групп на член из другой группы.

Понятие "полностью-D" относится к пептидам, в которых  $\geq 75$ ,  $\geq 80$ ,  $\geq 85$ ,  $\geq 90$ ,  $\geq 95$  и 100% аминокислот имеют D-конфигурацию.

Термин "средство" используется для описания соединения, которое обладает или может обладать фармакологическим действием. Средства включают соединения, которые являются известными лекарствами, соединениями с идентифицированным фармакологическим действием, но для которых проводится дополнительная терапевтическая оценка, и соединения, которые перечислены в коллекциях и библиотеках, для которых необходим скрининг на фармакологическое действие.

Термины "амилоидное заболевание" или "амилоидоз" относятся к любому ряду заболеваний, при которых накопление или образование амилоидных бляшек являются их симптомом или частью патологического процесса. "Амилоидная бляшка" представляет собой внеклеточное депо, состоящее в основном из белковых фибрилл. В общем фибриллы состоят из доминантного белка или пептида; вместе с тем бляшка может также включать дополнительные компоненты, которые являются пептидными или непептидными молекулами, как описано в настоящем изобретении.

"Амилоидный белок" или "амилоидный пептид" является белком или пептидом, который может подвергаться расщеплению, конформационному изменению, агрегации или фибрилlogenезу, что приводит к образованию патологических олигомеров, амилоидных фибрилл, амилоидных бляшек и/или амилоидных компонентов.

"Амилоидный компонент" представляет собой любую молекулярную единицу, которая присутствует в амилоидной бляшке, включая антигенные части таких молекул. Амилоидные компоненты включают без ограничения белки, пептиды, протеогликаны и углеводы.

"Антиамилоидное средство" является средством, способным индуцировать иммунный ответ на амилоидный компонент бляшки у субъекта подтипа позвоночных, при введении способами активной или пассивной иммунизации.

Термины "AA-белок" или "AA-пептид" относятся к форме амилоидного белка или пептида A, образованного путем протеолитического расщепления сывороточного A-амилоидного белка (SAA), и мономерного и агрегированного, и растворимого и нерастворимого.

Понятия "агрегированный амилоидный белок", или "агрегированный амилоидный пептид", или "амилоидный агрегат" относятся к патологической, немономерной, агрегированной форме амилоидного белка или амилоидного пептида. Агрегированные амилоидные белки и амилоидные пептиды могут быть растворимыми или нерастворимыми. Некоторые агрегированные амилоидные белки и агрегированные амилоидные пептиды могут образовывать олигомеры, фибриллы и/или амилоидные бляшки. В настоящем изобретении рассматриваются примеры таких агрегированных амилоидных белков и амилоидных пептидов, включающих фибриллярные пептиды и белки.

Термин "AA-агрегат" относится к агрегированной форме AA.

Терапевтические средства изобретения обычно по существу не содержат нежелательных примесей. Это означает, что средство обычно имеет чистоту по меньшей мере около 50% (вес./вес.), а также по существу не содержит вредные белки и загрязнители. Иногда средства имеют чистоту по меньшей мере около 80% (вес./вес.), более предпочтительно чистота по меньшей мере составляет около 90 или 95% (вес./вес.). Вместе с тем, используя общепринятые способы очистки белка, можно получать гомогенные пептиды с чистотой по меньшей мере 99% (вес./вес.). Терапевтические средства изобретения могут предотвращать или лечить болезнь, связанную с амилоидными депо, или обладать профилактическим действием.

Специфичное связывание между единицами означает, что единицы имеют взаимную аффинность друг к другу, которая по меньшей мере в 10, в 100 или в 100 раз больше, чем аффинность контрольной единицы, например постороннего антигена или антитела к другому антигену. Взаимная аффинность указанных двух единиц составляет друг для друга обычно по меньшей мере  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Предпочтительными являются показатели аффинности более  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Термины "иммуноглобулин" или "антитело" (используемые в настоящем изобретении взаимозаменяемо) относятся к антигенсвязывающему белку, который обладает способностью специфически связываться с антигеном, имеющему основную структуру в виде цепи с четырьмя полипептидами, состоящую из двух тяжелых и двух легких цепей, и указанные цепи стабилизированы, например, межцепочечными



дисульфидными связями. Тяжелые и легкие цепи свернуты в домены. Термин "домен" относится к глобулярному участку тяжелой или легкой цепи полипептида, содержащему пептидные петли (например, содержащему 3-4 пептидные петли), устойчивости которому придается, например, посредством  $\beta$ -складчатой листовой структуры и/или межцепочечной дисульфидной связи. Дополнительно в изобретении упоминаются "постоянные" или "вариабельные" домены, в зависимости от относительной недостаточности вариантов последовательностей в пределах доменов у членов разных групп в случае "постоянного" домена или значительного количества вариантов в пределах доменов у членов разных групп в случае "вариабельного" домена". В изобретении взаимозаменяемо упоминаются "постоянные" области легкой цепи, "постоянные домены легкой цепи", "постоянные области легкой цепи", "CL" области или "CL" домены". "Постоянные" домены тяжелой цепи взаимозаменяемо упоминаются в изобретении как "постоянные области тяжелой цепи", "постоянные домены тяжелой цепи", "CH" области или "CH" домены". "Вариабельные" домены легкой цепи взаимозаменяемо упоминаются как "вариабельные области легкой цепи", "вариабельные домены легкой цепи", "VL" области или "VL" домены". "Вариабельные" области тяжелой цепи взаимозаменяемо упоминаются как "вариабельные области тяжелой цепи", "вариабельные домены тяжелой цепи", "VH" области или "VH" области.

Термин "область" относится к части или участку цепи антитела и включает постоянные или вариабельные домены, определение которых приведено выше, а также более дискретные части или участки указанных доменов. Например, вариабельные области или домены легкой цепи включают "участки, определяющие комплементарность" или "CDR", вставленные между "каркасными областями" или "FR", упоминаемые в изобретении.

Иммуноглобулины или антитела могут существовать в мономерной или полимерной форме. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, связывающего антиген или конкурирующего с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого они были получены) для связывания антигена (т.е. специфического связывания). Термин "конформация" относится к третичной структуре белка или полипептида (например, к антителу, цепи антитела, его домену или области). Например, понятие "конформация легкой (или тяжелой) цепи" относится к третичной структуре вариабельной области легкой (или тяжелой) цепи, и фраза "конформация антитела" или "конформация фрагмента антитела" относится к третичной структуре антитела или его фрагмента.

"Специфичное связывание" антитела означает, что антитело проявляет заметную аффинность к антигену или к предпочтительной антигенной детерминанте и предпочтительно не показывает значительной кросс-реактивности. "Заметное" или предпочтительное связывание включает связывание с аффинностью по меньшей мере  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$   $M^{-1}$  или  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Предпочтительными являются показатели аффинности более  $10^7$   $M^{-1}$ , более предпочтительными более  $10^8$   $M^{-1}$ . Промежуточные значения указанных здесь показателей также считаются входящими в объем по настоящему изобретению, и предпочтительную связывающую аффинность можно обозначить в диапазоне показателей, например, от  $10^6$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ , предпочтительно от  $10^7$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ , более предпочтительно от  $10^8$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Антитело, которое "не проявляет значительной кросс-реактивности", представляет собой антитело, которое не будет в заметной степени связываться с нежелательной единицей (например, с нежелательной белковой единицей). Например, антитело, которое специфически связывается с AA, будет в заметной степени связываться с AA, но не будет в значительной степени реагировать с белками или пептидами не AA-типа (например, с белками или пептидами не AA-типа, включенными в бляшки). Антитело, специфическое для предпочтительной антигенной детерминанты, не будет, например, в значительной степени перекрестно реагировать с посторонними эпитопами в том же белке или пептиде. Специфичное связывание можно определять согласно любым принятым в данной области техники способам для определения такого связывания. Предпочтительно специфическое связывание определяют с помощью анализа Scatchard и/или анализов конкурентного связывания.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела производят способами рекомбинантных ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Fv, единственные цепи и одноцепочечные антитела. Дополнительные фрагменты антитела и варианты эффекторных функций рассмотрены в изобретении в разделе "Антитела". В отличие от "биспецифичных" или "бифункциональных" иммуноглобулинов или антител считается, что каждый иммуноглобулин или антитело имеет свой идентичный участок связывания. "Биспецифические" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных участка связывания. Биспецифичные антитела можно получать множеством способов, включающих слияние гибридом или связывание Fab' фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Термины "гуманизированный иммуноглобулин" или "гуманизированное антитело" относятся к иммуноглобулину или антителу, которое включает по меньшей мере одну цепь гуманизированного иммуноглобулина или антитела (т.е. по меньшей мере одну гуманизированную легкую или тяжелую цепь). Термины "цепь гуманизированного иммуноглобулина" или "цепь гуманизированного антитела" (т.е.

"легкая цепь гуманизированного иммуноглобулина" или "тяжелая цепь гуманизированного иммуноглобулина") относятся к цепи иммуноглобулина или антитела (т.е. к легкой или тяжелой цепям соответственно), имеющей вариабельную область, которая включает вариабельную каркасную область, по существу, из человеческого иммуноглобулина или антитела, и участки, определяющие комплементарность (CDR) (например, по меньшей мере один CDR, предпочтительно два CDR, более предпочтительно три CDR), от иммуноглобулина или антитела, по существу, нечеловеческого происхождения, и дополнительно включает постоянные области (например, по меньшей мере одну постоянную область или ее часть в случае легкой цепи и предпочтительно три постоянные области в случае тяжелой цепи). Термины "гуманизированная вариабельная область" (например, "гуманизированная вариабельная область легкой цепи" или "гуманизированная вариабельная область тяжелой цепи") относятся к вариабельной области, которая включает вариабельную каркасную область, по существу, из человеческого иммуноглобулина или антитела и участки, определяющие комплементарность (CDR) из иммуноглобулина или антитела, по существу, нечеловеческого происхождения.

Выражение "по существу, из человеческого иммуноглобулина или антитела" или "по существу, человеческий" означает, что выравнивание аминокислотной последовательности с человеческим иммуноглобулином или антителом в целях сравнения показывает идентичность областей по меньшей мере 80-90%, предпочтительно 90-95%, более предпочтительно 95-99% (т.е. локальная идентичность последовательности) по отношению к человеческой последовательности каркасной или постоянной области, что позволяет осуществлять, например, консервативные замены, замены консенсусных последовательностей, замены зародышевых линий, обратные мутации и т.п. Вставка консервативных замен, замен консенсусных последовательностей, замен зародышевых линий, обратных мутаций и т.п. часто упоминается "как оптимизация" гуманизированного антитела или цепи. Выражение "по существу, из иммуноглобулина или антитела нечеловеческого происхождения" или "по существу, нечеловеческий" означает, что последовательность иммуноглобулина или антитела является идентичной по меньшей мере на 80-95%, предпочтительно 90-95%, более предпочтительно на 96, 97, 98 или 99% последовательности нечеловеческого организма, например млекопитающего нечеловеческого происхождения.

Соответственно, все области или остатки гуманизированного иммуноглобулина или антитела или цепи гуманизированного иммуноглобулина или антитела, кроме, возможно, участков CDR, по существу идентичны соответствующим областям или остаткам одной или более нативных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Термин "соответствующая область" или "соответствующий остаток" относится к области или остатку во второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которая занимает такое же (т.е. эквивалентное) положение, как и область или остаток в первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, если первые и вторые последовательности оптимально выравнены в целях сравнения.

В понятия "гуманизированный иммуноглобулин" или "гуманизированное антитело" не входят химерные иммуноглобулины или антитела, как указано ниже. Гуманизированные иммуноглобулины или антитела являются химерными по своей конструкции (т.е. они содержат области белков более чем от одного вида), они включают дополнительные признаки (т.е. вариабельные области, содержащие остатки донорской CDR и остатки акцепторного каркаса), но вместе с тем они не относятся к химерным иммуноглобулинам или антителам, указанным в изобретении.

Термины "химерный" иммуноглобулин или "химерное" антитело относятся к иммуноглобулину или антителу, вариабельные области которых происходят от первого вида и постоянные области которых происходят от второго вида. Химерные иммуноглобулины или антитела можно конструировать, например, с помощью генной инженерии, из генных сегментов иммуноглобулина, принадлежащего разным видам.

"Антиген" представляет собой единицу (например, белковоподобную единицу или пептид), с которым антитело специфически связывается.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту в антигене, с которым специфически связываются иммуноглобулин или антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент). Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, прилежащих друг к другу в третичной структуре белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичным свертыванием, обычно исчезают при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации антигенных детерминант включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, в издании *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996).

Типичные антитела по изобретению включают антитело или его фрагмент, который специфически связывается с эпитопом, включающим  $X_1EDX_2$ , в агрегированном амилонидном белке, который связывается с эпитопом, включающим  $X_1EDX_2$ , который также связывается, например, с антителами 2A4, 7D8 или 8G9. Антитела, которые распознают аналогичный эпитоп, можно идентифицировать с помощью

простого иммуноанализа, демонстрирующего способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью, т.е. анализом конкурентного связывания. Определение конкурентного связывания проводят с помощью анализа, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референс-антитела с общим антигеном, таким как  $\beta$ . Известны многие типы анализов конкурентного связывания, например прямой или непрямой твердофазный радиоиммуноанализ (РИА), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (см. публикации Stahli et al., *Methods in Enzymology*, 9:242 (1983)); прямой твердофазный ИФА с биотином-авидином (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); прямой твердофазный анализ с меткой, прямой твердофазный сэндвич-анализ с меткой (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); прямой твердофазный РИА с использованием метки  $^{125}\text{I}$  (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный ИФА с биотином-авидином (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и прямой РИА с мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Обычно такие анализы охватывают использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клетки, несущей очищенный антиген, немеченного тестового иммуноглобулина и меченого стандартизированного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества меток, связанных с твердой поверхностью или клеткой в присутствии тестового иммуноглобулина. Обычно тестовый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурентное антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание референс-антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше.

Эпитоп также распознается иммунными клетками, например В-клетками и/или Т-клетками. Клеточное распознавание эпитопа можно выявлять в анализах *in vitro*, измеряющих антигензависимую пролиферацию, которую обнаруживают по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, по секреции цитокина, секреции антитела или по антигензависимому киллингу (анализ цитотоксических Т-лимфоцитов).

Термин "неоэпитоп" относится к новому и/или уникальному сайту на антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки.

Термин "неоэпитопные антитела" относится к антителам, которые специфически распознают новую N-концевую или C-концевую аминокислотную последовательность, появившуюся путем протеолитического расщепления молекулы, но не связываются с таким эпитопом на нативной (нерасщепленной) молекуле. Термин "неоэпитопные антитела" может относиться к антителам, которые специфически распознают новую N-концевую или C-концевую аминокислотную последовательность, полученную протеолитическим расщеплением SAA, но не связываются с таким эпитопом на нативной (нерасщепленной) молекуле SAA. Некоторые неоэпитопные антитела связываются как с растворимым, так и с нерастворимым AA и вызывают диссоциацию агрегатов AA, включающих AA-фибриллы. "Неоэпитопное антитело" может также представлять собой антитело, которое специфически распознает новый эпитоп, который способен связываться с антителом только после того, как произойдет конформационное изменение белка, например, как в случае AL-амилоидоза, и легкую цепь, когда экспрессируется только легкая цепь и образует амилоид.

Термин "иммунологический ответ" или "иммунный ответ" означает развитие полезной гуморальной (опосредованной антителом) и/или клеточной (опосредованной антигенспецифичными Т-клетками или продуктами их секреции) реакции, направленной против амилоидного пептида у больного реципиента. Такой ответ может быть активным ответом, вызванным введением иммуногена, или пассивным ответом, вызванным введением антитела или примированных Т-клеток. Клеточный иммунный ответ вызывается представлением полипептидных эпитопов в ассоциации с молекулами МНС I класса или II класса для активации антигенспецифических хелперных Т-клеток  $\text{CD4}^+$  и/или цитостатических Т-клеток  $\text{CD8}^+$ . В такой ответ также может вовлекаться активация моноцитов, макрофагов, клеток НК (натуральных киллеров), базофилов, дендритных клеток, астроцитов, микроглиальных клеток, ацидофильных гранулоцитов или других компонентов врожденного иммунитета. Присутствие клеточно-опосредованного иммунного ответа можно определить анализом пролиферации (Т-клетки  $\text{CD4}^+$ ) или ЦТЛ (цитотоксических Т-лимфоцитов) (см., Burke, выше; Tigges, выше). Можно отдельно оценивать относительный вклад гуморального и клеточного ответа на защитный или терапевтический эффект иммуногена путем отдельного выделения антител и Т-клеток от иммунизированного сингенного животного и измерения защитного или терапевтического действия у второго субъекта.

"Иммуногенное средство" или "иммуноген" способен индуцировать иммунологический ответ на самого себя при введении его млекопитающему, необязательно в сочетании с адьювантом.

Термин "голый полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, не образующему комплекс с коллоидными материалами. Голые полинуклеотиды иногда клонируют в плазмидный вектор.

Термин "адьювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с антигеном усиливает иммунный ответ на антиген, но при введении его единственным не вызывает иммунный ответ на антиген. Адьюванты могут усиливать иммунный ответ посредством ряда механизмов, включающих рекрутинг лимфоцитов, активацию В- и/или Т-клеток и активацию макрофагов.

Термины "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяют количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желательного эффекта. Термин "терапев-

тически эффективная доза" определяют как количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичного устранения болезни и ее осложнений у пациента, уже страдающего указанной болезнью. Количество, эффективное для этого применения, будет зависеть от тяжести инфекции и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

Термин "пациент" включает субъекты человеческого происхождения и других млекопитающих, которые получают или профилактическое, или терапевтическое лечение.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с эпитопом, включающим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, и которые конкурируют за связывание с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$ , например с антителами 2A4, 7D8 или 8G9.

Конкурирование между антителами определяют анализом, в котором тестовый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референс-антитела с общим антигеном, например АА.

Известны многие типы анализов конкурентного связывания, например: прямой или непрямой твердофазный радиоиммуноанализ (РИА), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli et al., *Methods in Enzymology*, 9:242-253 (1983)); прямой твердофазный ИФА с биотином-авидином (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); прямой твердофазный анализ с меткой, прямой твердофазный сэндвич-анализ с меткой (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); прямой твердофазный РИА с использованием метки  $^{125}I$  (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)); прямой твердофазный ИФА с биотином-авидином (Cheung et al., *Virology*, 176:546-552 (1990)) и прямой РИА с мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). Обычно такие анализы подразумевают использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клеткой, несущей очищенный антиген, немеченого тестового иммуноглобулина и меченого стандартизированного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества меток, связанных с твердой поверхностью или клеткой в присутствии тестового иммуноглобулина. Обычно тестовый иммуноглобулин присутствует в избытке. Антитела, идентифицированные в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связанные с одним и тем же эпитопом, что и референс-ссылки, и антитела, связанные со смежным эпитопом, расположенным в достаточной близости к эпитопу с присоединенным референс-антителом, чтобы возникло стерическое несоответствие. Обычно конкурентное антитело, находясь в избытке, будет ингибировать специфическое связывание референс-антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-75%.

Антитело, которое специфически связывается с амилоидным белком, представляет собой антитело, которое связывается с амилоидным белком с аффинностью по меньшей мере  $10^7 M^{-1}$ . Некоторые антитела связываются с амилоидным белком с показателями аффинности от  $10^8$  до  $10^{11} M^{-1}$ .

Антитело, которое специфически связывается с агрегированным амилоидным белком, таким как АА-агрегат, без специфического связывания с мономерным амилоидным белком, представляет собой антитело, которое связывается с агрегированным амилоидным белком, таким как, например, фибриллы (например, АА в агрегированной  $\beta$ -складчатой листовой форме, например, от трупа большого амилоидом АА или от трансгенной модели животных), как описано выше, и его специфичная связывающая аффинность к мономерным формам амилоидного белка ниже по меньшей мере в десять раз и обычно по меньшей мере в 100 раз. Например, такое антитело могло бы связываться с растворимым АА с аффинностью  $10^9 M^{-1}$  и с бляшками с аффинностью менее  $10^7 M^{-1}$ . Аффинность таких антител для бляшек составляет обычно менее  $10^7$  или  $10^6 M^{-1}$ . Такие антитела дополнительно или альтернативно определяют по интенсивности флуоресценции по сравнению с посторонним контрольным антителом, (например, с антителом или смесью поликлональных антител к АА-пептиду с обратной последовательностью), при контакте антител с фибриллами, и оценивают связывание по флуоресцентным меткам. Интенсивность флуоресценции антител, связанных с растворимым пептидом АА, которые не связываются с бляшками, находится в пределах фактора пять, иногда в пределах фактора два и иногда неразличима в границах экспериментальной ошибки интенсивности флуоресценции контрольного антитела.

Композиции или способы, "содержащие" один или несколько упомянутых элементов, могут включать другие элементы, конкретно не упомянутые. Например, композиция, которая содержит АА-пептид, охватывает и выделенный АА-пептид, и АА-пептид в качестве компонента полипептидной последовательности большей длины.

## II. Амилоидные заболевания

### 1. Краткий обзор и патогенез.

Амилоидные заболевания, или амилоидозы, включают ряд патологических состояний, проявляющихся широким разнообразием объективных симптомов. Общим для этих заболеваний является присутствие аномальных внеклеточных депо фибриллярного белка, называемых "амилоидными депо" или "амилоидными бляшками", диаметр которых обычно составляет 10-100 мкм, с их локализацией в определенных органах или участках тканей. Такие бляшки состоят в основном из растворимого белка или пептида природного происхождения. Эти нерастворимые депо состоят в общем из латеральных агрегатов из фибрилл диаметром около 10-15 нм. Амилоидные фибриллы производят характерное светло-зеленое

двупреломление в поляризованном свете при окрашивании красителем Конго красным. Указанные заболевания классифицируют в зависимости от основных фибриллярных компонентов, образующих бляшечные депо, как рассмотрено ниже.

Пептиды или белки, образующие бляшечные депо, часто происходят из более крупного белка-предшественника. Более конкретно, в патогенез амилоидных фибриллярных депо обычно вовлечено протеолитическое расщепление на фрагменты "аномального" белка-предшественника. Эти фрагменты обычно собраны в антипараллельные  $\beta$ -складчатые листы; вместе с тем, известны некоторые нерасщепленные формы белка-предшественника, способные к агрегации и образованию фибрилл при семейной амилоидной полинейропатии (вариант транстиретиновых фибрилл), и амилоидозе, связанном с диализом ( $\beta_2$ -микроглобулиновые фибриллы) (Tan, et al., 1994, см. выше).

## 2. Клинические синдромы.

В этом разделе приведено описание основных типов амилоидозов, в которое включено характерное строение их фибриллярных бляшек. Общим открытием по настоящему изобретению является возможность лечения амилоидных заболеваний путем введения средств, действие которых направлено на активацию иммунного ответа против компонента или разных компонентов амилоидных депо, конкретных для каждого заболевания. Как рассмотрено более подробно ниже в разделе С, такие компоненты предпочтительно представляют собой элементы фибрилл, которые образуют бляшки. В разделах ниже приведены примеры основных форм амилоидоза, которые не предназначены ограничивать объем по настоящему изобретению.

### (a) Амилоидозы AL-типа.

Амилоидные депо AL-типа обычно связаны практически с любой дискразией В-лимфоцитарной линии, варьируя от злокачественного развития плазматических клеток (множественная миелома) до доброкачественной моноклональной гаммапатии. Иногда присутствие амилоидных депо может быть первичным индикатором основной дискразии.

Фибриллы в амилоидных депо AL-типа состоят из легких цепей моноклонального иммуноглобулина или их фрагментов. Более конкретно, фрагменты происходят из N-концевой области легкой цепи (каппа или лямбда) и содержат полностью вариабельный домен ( $V_L$ ) или его часть. Депо обычно возникают в мезенхимальных тканях, вызывая периферическую и автономную нейропатию, синдром запястного канала, макроглоссию, рестриктивную кардиомиопатию, артропатию крупных суставов, иммунные дискразии, миеломы, а также оккультные дискразии. Вместе с тем, необходимо отметить, что может быть вовлечена практически любая ткань, в особенности висцеральные органы, например, сердце.

### (b) Наследственные системные амилоидозы.

Существует множество форм наследственных системных амилоидозов. Хотя они представляют собой относительно редкие состояния, появление симптомов во взрослом возрасте и характер наследования (обычно аутосомно-доминантный) приводят к персистентному существованию таких заболеваний в популяции. В общем указанные синдромы обусловлены точечными мутациями в белке-предшественнике, что приводит к продукции амилоидогенных пептидов или белков. Табл. 2 приводит обобщенные данные фибриллярного строения при разных формах указанных заболеваний в качестве примеров.

Таблица 2

Наследственные амилоидозы<sup>a</sup>

Фибриллярный пептид/белок	Генетический вариант	Клинический синдром
Транстиретин и фрагменты (ATTR)	Met30, многие другие	Семейная амилоидная полинейропатия (САН), (главным образом периферические нервы)
Транстиретин и фрагменты (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	Вовлечено сердце, преимущественно без нейропатии

N-концевой фрагмент аполипопротеина A1 (apoA1)	Arg26	Семейная амилоидная полинейропатия (САН), (главным образом периферические нервы)
N-концевой фрагмент аполипопротеина A1 (apoA1)	Arg26, Arg50, Arg60, другие	Ostertag-тип, не-нейропатическая форма (преобладает вовлечение висцеральных органов)
Лизозим (Alys)	Thr56, His67	Ostertag-тип, не-нейропатическая форма (преобладает поражение висцеральных органов)
Фрагмент $\alpha$ -цепи фибриногена	Leu554, Val526	Ostertag-тип, не-нейропатическая форма (преобладает поражение висцеральных органов)
Фрагмент гельсолина (Agel)	Asn187, Tyr187	Краниальная нейропатия с решетчатой дистрофией роговицы
Фрагмент цистатина C	Glu68	Наследственная церебральная геморрагия (церебральная амилоидная ангиопатия) - исландский тип
$\beta$ -амилоидный белок (A $\beta$ ), полученный из амилоидного белка-предшественника (APP)	Gln693	Наследственная церебральная геморрагия (церебральная амилоидная ангиопатия) - голландский тип
$\beta$ -амилоидный белок (A $\beta$ ), полученный из амилоидного белка-предшественника (APP)	Ile717, Phe717, Gly717	Семейная болезнь Альцгеймера

β -амилоидный белок (Aβ), полученный из амилоидного белка-предшественника (APP)	Asn670, Leu671	Семейное слабоумие - предположительно болезнь Альцгеймера
Прионный белок (PrP), происходящий из белка-предшественника PrP, вставка 51-91	Leu102, Val167, Asn178, Lys200	Семейная болезнь Крейтцфельдта-Якоба; синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (наследственные спонгиозные энцефалопатии, прионные болезни)
AA, происходящий из сывороточного амилоидного белка (ApoSSA)		Семейная средиземноморская лихорадка, с преобладающим поражением почек (аутосомно-рецессивная)
AA, происходящий из сывороточного амилоидного белка (ApoSSA)		Синдром Макла-Уэллса, нефропатия, глухота, крапивница, боль в конечностях
Неизвестно		Кардиомиопатия с персистирующей асистолией предсердий
Неизвестно		Кожные депо (буллезные, папулезные, кожно-пустульные)

<sup>a</sup> Данные получены из публикации Tan & Perus, 1994, см. выше.

Данные, предоставленные в табл. 2, приведены в качестве примеров и не предназначены ограничивать объем по настоящему изобретению. Например, были описаны больше 40 отдельных точечных мутаций в гене транстиретина, все из которых дают начало клинически сходным формам семейной амилоидной полинейропатии.

Транстиретин (TTR) является белком размером 14 кДа, который также иногда называют преальбумином. Он вырабатывается в печени и хориоидном сплетении и участвует в транспорте гормонов щитовидной железы и витамина А. По меньшей мере 50 разных форм белка, отличающиеся единственной заменой аминокислоты, отвечают за разные формы семейной амилоидной полинейропатии. Например, замена пролина на лейцин в положении 55 приводит к особенно прогрессирующей форме нейропатии; замена метионина на лейцин в положении 111 приводит к тяжелому поражению сердца у пациентов из Дании. Амилоидные депо, выделенные из сердечной ткани больных системным амилоидозом, показали, что депо состоят из гетерогенной смеси TTR и их фрагментов, вместе называемых ATTR, для которых были описаны полные параметры длины последовательностей. Из таких бляшек можно извлекать фибриллярные компоненты ATTR и определять их структуру и последовательности согласно известным в данной области техники способам (например, Gustavsson, A., et al., *Laboratory Invest.* 73:703-708, 1995; Kametani, F., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125:622-628, 1984; Pras, M., et al., *PNAS* 80:539-42, 1983).

У людей, несущих точечные мутации в молекуле аполипопротеина A1 (например, Gly→Arg26; Trp→Arg50; Leu→Arg60), выявляют форму амилоидоза ("тип Ostertag"), которая отличается наличием депо аполипопротеинового белка A1 или его фрагментов (AApoA1). У таких больных обнаруживают низкие уровни липопротеинов высокой плотности (ЛВП) и периферическую нейропатию или почечную недостаточность.

Другая форма не-нейропатического наследственного амилоида Ostertag-типа, наблюдаемая в английских семьях, обусловлена мутацией в альфа-цепи фермента лизозима (например,  $\text{Pe} \rightarrow \text{Thr56}$  или  $\text{Asp} \rightarrow \text{His57}$ ). В этом случае происходит накопление фибрилл мутантного белка лизозима (Alys), обычно проявляющееся у больных с нарушением функции почек. Указанный белок, в отличие от большинства фибрилл-образующих белков, описанных в настоящем изобретении, обычно присутствует в своей полной (нефрагментированной) форме (Benson, M.D., et al. CIBA Fdn. Symp. 199:104-131, 1996).

$\beta$ -амилоидный пептид ( $\text{A}\beta$ ) представляет собой пептид из 39-43 аминокислот, полученный путем протеолиза из более крупного белка, называемого бета-амилоидным белком-предшественником ( $\beta\text{APP}$ ). Мутации в  $\beta\text{APP}$  приводят к семейным формам болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и/или сенильного слабоумия, для которых характерны церебральные депо бляшек, состоящих из  $\text{A}\beta$ -фибрилл и других компонентов, которые более подробно описаны ниже. Известные мутации в  $\text{APP}$ , связанные с болезнью Альцгеймера, возникают проксимальнее к сайтам расщепления  $\beta$ -, или  $\gamma$ -секретазы, или в  $\text{A}\beta$ . Например, положение 717 является ближайшим к сайту расщепления  $\gamma$ -секретазы в  $\text{APP}$  при его процессировании до  $\text{A}\beta$ , и положения 670/671 являются ближайшими к сайту расщепления  $\beta$ -секретазы. Мутации в любом из этих остатков могут привести к болезни Альцгеймера, по-видимому, посредством увеличения количества 42/43 аминокислот  $\text{A}\beta$ -формы, созданного из  $\text{APP}$ . Структура и последовательность  $\text{A}\beta$ -пептидов разной длины известна в данной области техники. Такие пептиды можно изготавливать согласно способам, известным в данной области техники (например, Glenner and Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 129:885-890, 1984; Glenner and Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 122:1131-1135, 1984). Дополнительно, коммерчески доступны разные формы пептидов.

Синуклеин представляет собой связанный с синапсом белок, который напоминает алипопротеин и содержит обилие нейрональной цитозоли и пресинаптических терминалов. Пептидный фрагмент, полученный из  $\alpha$ -синуклеина, называемого  $\text{NAC}$ , также является компонентом амилоидных бляшек болезни Альцгеймера. (Clayton et al., 1998). Этот компонент также представляет собой цель иммунологического лечения согласно настоящему изобретению, как подробно описано ниже.

Гельсолин является кальций-связывающим белком, который связывается с фрагментами актиновых филаментов. Мутации белка в положении 187 (например,  $\text{Asp} \rightarrow \text{Ash}$ ;  $\text{Asp} \rightarrow \text{Tyr}$ ) приводят к возникновению формы наследственного системного амилоидоза, обычно выявляемого у пациентов в Финляндии, а также у людей в Голландии или Японии. У людей с указанным повреждением фибриллы, образованные из фрагментов гельсолина (Agel), обычно состоят из аминокислот 173-243 (карбокси-концевой фрагмент размером 68 кДа) и накапливаются в кровеносных сосудах и базальных мембранах, что приводит к дистрофии роговицы и крапильной нейропатии, которая прогрессирует до периферической нейропатии, дистрофических изменений кожи и других органов, где происходит накопление. (Kangas, H., et al. Human Mol. Genet. 5(9):1237-1243, 1996).

Другие подвергшиеся мутации белки, такие как мутантная альфа-цепь фибриногена (AfibA) и мутантный цистатин С (Acys), также образуют фибриллы и вызывают характерные наследственные патологии. Фибриллы AfibA образуют депо, характерные для не-нейропатического наследственного амилоида с почечной патологией; депо Acys характерны при наследственной церебральной амилоидной ангиопатии, выявляемой в Исландии. (Isselbacher, et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, et al., см. выше). По меньшей мере, в некоторых случаях у больных церебральной амилоидной ангиопатией (ЦАА) выявляли амилоидные фибриллы, содержащие немутантную форму цистатина С в соединении с бета-белком. (Nagai, A., et al. Molec. Chem. Neuropathol. 33:63-78, 1998).

В настоящее время некоторые формы прионной болезни считаются наследственными, при этом ранее предполагалось, что до 15% случаев имеют инфекционное происхождение ((Baldwin, et al., in Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, John Wiley and Sons, New York, 1995). При указанных прионных патологиях у больных разрастаются бляшки, состоящие из аномальных изоформ нормального прионного белка ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). Преобладающая мутантная изоформа  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , также называемая  $\text{A}\text{Sc}$ , отличается от нормального клеточного белка своей устойчивостью к расщеплению протеазой, нерастворимостью при экстракции детергентами, накоплением во вторичных лизосомах, посттрансляционным синтезом и высоким содержанием  $\beta$ -складчатых листов. Были установлены генетические связи по меньшей мере для пяти мутаций, приводящих к болезни Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), синдрома Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (ГШШ) и фатальной семейной бессоннице (ФСБ) (Baldwin). Способы экстракции фибриллярных пептидов из скрапи-фибрилл, определения последовательностей и изготовления таких пептидов известны в данной области техники (например, публикации Beekes M., et al. J. Gen. Virol. 76:2567-76, 1995).

Например, одна из форм ГШШ связана с мутацией  $\text{PrP}$  в кодоне 102, тогда как теленцефалическая форма ГШШ отличается мутацией в кодоне 117. Мутации в кодонах 198 и 217 вызывают форму ГШШ, при которой нейритные бляшки при болезни Альцгеймера имеют характерное содержание  $\text{PrP}$  вместо  $\text{A}\beta$ -пептида. Некоторые формы семейной БКЯ были связаны с мутациями в кодонах 200 и 210; мутации в кодонах 129 и 178 были обнаружены и при семейной форме БКЯ и при семейной форме ФСБ. (Baldwin, см. выше).



(с) Сенильный системный амилоидоз.

Амилоидные депо, как системные, так и фокальные, увеличиваются с возрастом. Например, фибриллы дикого типа транстиретина (ТТР) обычно обнаруживают в сердечной ткани пожилых людей. Указанные депо могут быть бессимптомными, клинически молчащими или могут приводить к остановке сердца. Бессимптомные фибриллярные фокальные депо могут также возникать в мозге (Аβ), в амилоидных тельцах (согрома amyloasea) простаты (микроглобулин Аβ<sub>2</sub>), суставах и семенных пузырьках.

(d) Церебральный амилоидоз.

Локальные амилоидные депо часто встречаются в мозге, особенно у пожилых людей. Наиболее частый тип амилоида в мозге состоит в основном из фибриллярного пептида Аβ и приводит к слабоумию или спорадической (ненаследственной) болезни Альцгеймера. Фактически, частота встречаемости спорадической болезни Альцгеймера значительно превышает частоту форм, являющихся наследственными. Фибриллярные пептиды, образующие эти бляшки, очень сходны с описанными выше, в отношении наследственных форм болезни Альцгеймера (БА).

(e) Амилоидоз, связанный с диализом.

Бляшки, состоящие из β<sub>2</sub>-микроглобулиновых фибрилл (Аβ<sub>2</sub>М), обычно развиваются у больных, которым проводят продолжительный гемодиализ или перитонеальный диализ. β<sub>2</sub>-микроглобулин представляет собой полипептид в 11,8 кДа, который является легкой цепью антигенов МНС I класса, присутствующие на всех клетках, содержащих ядра. При нормальных обстоятельствах он постоянно сбрасывается с клеточной мембраны и обычно фильтруется почками. Нарушение удаления β<sub>2</sub>-микроглобулина, например, в случае ослабления функции почек приводит к его накоплению в почке и других участках (прежде всего в богатых коллагеном тканях суставов). В отличие от других фибриллярных белков, молекулы Аβ<sub>2</sub>М обычно находятся в фибриллах в нефрагментированной форме (Benson, см. выше).

(f) Амилоидозы гормонального происхождения.

В эндокринных органах могут накапливаться амилоидные депо, особенно у пожилых людей. Гормон-секретирующие опухоли также могут нести амилоидные бляшки гормонального происхождения, фибриллы которых состоят из полипептидных гормонов, таких как кальцитонин (медуллярная карцинома щитовидной железы), островковый амилоидный полипептид (амилин; встречающийся у большинства больных диабетом II типа) и атриальный натрийуретический пептид (изолированный амилоидоз предсердий). Последовательности и структура указанных белков известны в данной области техники.

(g) Разные амилоидозы.

Существует множество других форм амилоидного заболевания, которые обычно проявляются в виде локализованных депо амилоида. Предполагают, что эти болезни обычно являются результатом локальной продукции и/или недостаточного катаболизма определенных предшественников фибрилл или предрасположенности конкретной ткани (такой как сустав) к образованию фибриллярного депо. Примеры таких идиопатических депо включают нодулярный амилоид AL-типа, кожный амилоид, эндокринный амилоид и связанный с опухолью амилоид.

### III. Амилоидные заболевания AA-типа

Амилоидоз AA-типа ранее называли вторичным или реактивным амилоидозом, поскольку он развивается вторично в добавление к существовавшему ранее или сопутствующему заболеванию. Такие заболевания включают без ограничения воспалительные заболевания, например ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическую артропатию, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета и болезнь Крона. Депо AA также образуются в результате хронических микробных инфекций, таких как лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит и болезнь Уиппла. Некоторые злокачественные новообразования могут также вызывать образование AA-фибрилярных амилоидных депо. Они включают такие патологии, как ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочевого тракта, базальноклеточная карцинома и волосатоклеточный лейкоз. Амилоидное заболевание AA-типа может также быть результатом наследственных воспалительных заболеваний, таких как семейная средиземноморская лихорадка. Дополнительно, амилоидное заболевание AA-типа может быть обусловлено лимфопролиферативными заболеваниями, такими как болезнь Кастлемана.

1. Воспалительные заболевания, связанные с амилоидозом AA-типа.

Ревматоидный артрит представляет собой хроническое системное заболевание, поражающее в первую очередь суставы. Симптомами ревматоидного артрита являются воспалительные изменения в синовиальных мембранах и суставных структурах (суставы), и атрофия и остеопороз (уменьшение плотности костей). В последних стадиях ревматоидного артрита развиваются деформации и анкилоз (неподвижность сустава). Модель ревматоидного артрита можно создать на мышцах или крысах путем введения коллагена II типа в полном адьюванте Фрейнда.

Ювенильный хронический артрит проявляется множеством форм; наиболее распространенным является ювенильный ревматоидный артрит. Он может развиваться у детей в любом возрасте, но наиболее часто отмечают начало симптоматики в возрасте от 2 до 6 лет. Существует три основных типа ювениль-

ного ревматоидного артрита, а именно пауциартикулярный артрит, полиартикулярный артрит и системный артрит (также известный как болезнь Стилла). Пауциартикулярный артрит обычно затрагивает четыре или меньше суставов, обычно крупные суставы, например коленные. Он может сопровождаться ригидностью сустава, заставляя ребенка хромать. Полиартикулярный артрит характеризуется вовлечением пяти или больше суставов, обычно мелких суставов рук и ног. У детей с полиартикулярным артритом часто наблюдается более тяжелая форма болезни. Системный артрит характеризуется опуханием суставов в сочетании с повышением температуры и розовой сыпью. Опухание суставов может не начинаться в течение нескольких месяцев или нескольких лет после начала повышения температуры. Болезнь может также затрагивать внутренние органы, такие как печень, сердце, селезенка и лимфатические узлы, и часто возникает анемия. Системный артрит имеет тенденцию к самостоятельному уменьшению, при этом небольшой процент больных детей может страдать тяжелой формой артрита, который продолжается в их взрослой жизни.

Анкилозирующий спондилит представляет собой ревматическое заболевание, при котором наблюдается артрит позвоночных и крестцово-подвздошных суставов и может возникать воспаление глаз, легких и сердечных клапанов. Симптомы варьируют от перемежающихся эпизодов болей в пояснице, которые наблюдаются в течение жизни, до тяжелого хронического заболевания, которое на протяжении жизни поражает позвоночник, периферические суставы и другие части тела, что приводит к развитию выраженной ригидности суставов и позвоночника, потере подвижности и деформации.

Псориаз является распространенным хроническим чешуйчатым дерматозом, с обострениями и ремиссиями, который имеет полигенный характер наследования. Симптомы псориаза заключаются в наличии округлых, сухих шелушащихся участков разных размеров, покрытых сероватыми, белыми или серовато-белыми чешуйками, со склонностью к их появлению на разгибательных поверхностях, ногтях, волосистой части головы, гениталиях и в пояснично-крестцовой области.

Псориатическая артропатия представляет собой заболевание, при котором псориаз связан с развитием артрита. Эта патология может иметь варианты проявления. Артрит обычно проявляется в умеренной форме и поражает только некоторые суставы. У некоторых пациентов болезнь носит тяжелый характер и обычно поражает пальцы и позвоночник. При вовлечении позвоночника симптомы очень похожи на симптомы анкилозирующего спондилита.

Синдром Рейтера представляет собой группу симптомов, состоящих из артрита, уретрита (воспаления мочевого тракта), конъюнктивита (воспаления оболочек глаза) и поражения кожи и слизистых оболочек. Синдром Рейтера также называется реактивным артритом, что означает, что указанный артрит возникает как "реакция" на инфекцию, которая началась в другом месте организма. Чаще всего с синдромом Рейтера связана бактериальная инфекция *Chlamydia trachomatis*, приобретенная при половом контакте. Некоторые другие бактериальные инфекции, связанные с синдромом Рейтера, включающие *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* и *Campylobacter*, возникают через пищеварительный тракт.

Болезнь Стилла у взрослых, также называемая болезнью Стилла с началом в старшем возрасте, является редким воспалительным состоянием, при котором поражаются внутренние органы, суставы и другие части организма. Она может внезапно начинаться и исчезать. При очень тяжелых случаях взрослая форма болезни Стилла становится хронической и чрезвычайно изнурительной, вызывающей нестерпимую боль и ригидность. Через много лет болезнь поражает жизненно важные органы, такие как сердце и легкие.

Синдром Бехчета является полисистемной патологией, которая может приводить к слепоте и неврологическим нарушениям, с проявлением в виде рецидивирующих язв ротовой полости и/или гениталий и хронического вторичного увеита. Для указанного синдрома характерны четыре основных симптома: афтозные язвы ротовой полости, поражение кожи, глазные симптомы и язвы области гениталий и иногда воспаление тканей и органов всего организма, включая желудочно-кишечный тракт, центральную нервную систему, сосудистую систему, легкие и почки. Артрит при синдроме Бехчета обычно носит интермиттирующий, самоограничивающийся, недеформирующий характер и ограничен коленными и голеностопными суставами.

Болезнь Крона представляет собой хроническое гранулематозное (с наличием маленьких зерноподобных телец или новообразований) воспалительное заболевание, которое поражает любую часть желудочно-кишечного тракта от ротовой полости до ануса; но обычно вовлечена подвздошная кишка (нижний участок тонкой кишки длиной три пята) с рубцеванием и утолщением кишечной стенки. Симптомы болезни Крона включают наличие хронической диареи, усиление перистальтического шума, судороги, возможно подтверждаемые потерей веса и отвращением к еде.

2. Хронические микробные инфекционные заболевания, связанные с амилоидозом АА-типа.

Лепра представляет собой инфекционное заболевание, характеризующееся обезображивающими рубцами на коже, поражением периферических нервов и прогрессирующим истощением.

Возбудителем лепры является микроорганизм *Mycobacterium leprae*, который имеет длительный инкубационный период и не обладает высокой контагиозностью. Распространены две формы лепры, туберкулоидная и лепроматозная. Обе формы вызывают образование кожных рубцов, но лепроматозная форма является более тяжелой с образованием больших, обезображивающих узлов (шишек и неровностей). В

конечной стадии лепры вызывает периферическое неврологическое поражение. Больные, страдающие лепрой продолжительное время, могут терять функции рук или ног из-за рецидивирующего поражения, обусловленного отсутствием чувствительности.

Туберкулез является контагиозной бактериальной инфекцией, вызываемой *Mycobacterium tuberculosis*. Болезнь характеризуется развитием гранулём (гранулярных опухолей) в пораженных тканях. В первую очередь поражаются легкие, но инфекция может распространяться на другие органы.

Бронхоэктаз представляет собой патологическую деструкцию и расширение крупных дыхательных путей. Бронхоэктаз часто вызывается рецидивирующим воспалением или инфекцией дыхательных путей. Классическим возбудителем, выявляемым у больных бронхоэктатической болезнью, является бактерия *Pseudomonas aeruginosa*, элиминация которой, как известно, очень затруднена. Частое инфицирование дыхательных путей указанной бактерией может приводить к обсеменению бронхов этим микроорганизмом, что вызывает у таких людей предрасположенность к псевдомональным пневмониям, для лечения которых необходимы специальные антибиотики.

Язвы лежачего положения, также называемые компрессионными язвами или пролежнями, представляют собой изъязвления кожи и подлежащих тканей, вызванные длительным давлением на вовлеченную область. Они начинаются с покраснения кожи, но быстро прогрессируют до ухудшения в виде образования пузырей, затем открытой раны и, наконец, язвы. Такие язвы обычно возникают на костных выступах, например пятках, на ягодицах в области копчика и на затылке.

Хронический пиелонефрит представляет собой инфекцию почек и мочеточников (трубочек, по которым моча выходит из почек). Пиелонефрит чаще всего возникает в результате инфицирования мочевых путей, особенно при наличии спорадического или постоянного обратного тока мочи из мочевого пузыря в мочеточники или почечную лоханку.

Остеомиелит является острой или хронической костной инфекцией, обычно вызываемой бактериями. Часто инфекция начинается в другой части организма и через кровь распространяется до кости. При инфицировании кости внутри нее образуется гной, что может приводить к абсцессу. При абсцессе нарушается кровоснабжение кости. При некрозе костной ткани в результате потери кровоснабжения остеомиелит становится хроническим. Хроническая инфекция может носить интермиттирующий характер и сохраняться в течение многих лет.

Болезнь Уиппла представляет собой редкое состояние, при котором происходит неадекватная абсорбция питательных веществ из кишечного тракта, обусловленная кишечной инфекцией.

Возбудителем болезни является бактерия *Tropheryma whippelii*. Симптомы включают диарею, кишечное кровотечение, боль в животе, потерю аппетита, потерю веса, утомляемость и слабость. Артрит и повышение температуры часто возникают за несколько лет до развития кишечных симптомов. Также у больных может выявляться неврологическая симптоматика. Диагноз основан на симптомах и результатах биопсии тканей тонкой кишки или других пораженных органов. При диагностике и проведении лечения болезнь Уиппла обычно можно излечить. Без лечения указанная патология обычно является смертельной.

### 3. Злокачественные новообразования, связанные с амилоидозом AA-типа.

Ходжкинская лимфома представляет собой рак лимфатической ткани, выявляемый в лимфатических узлах, селезенке, печени и в костном мозге. Первым симптомом указанного рака часто является увеличенный лимфатический узел. Болезнь может распространяться на соседние лимфоузлы и в дальнейшем может распространяться в легкие, печень или костный мозг.

Почечная карцинома представляет собой рак почки. Злокачественные клетки обнаруживают в выстилке почечных канальцев. Первым симптомом обычно является кровь в моче. Иногда поражаются обе почки. Указанный рак распространяется легко, чаще всего в легкие и другие органы. Карцинома почечных клеток является наиболее распространенным типом рака почек, за ним следует папиллярная почечно-клеточная карцинома, хромофобная почечная карцинома и карцинома собирательных протоков почек. Около 5% случаев карциномы почек не классифицированы, поскольку их симптоматика не вписывается ни в одну из категорий.

Кишечные карциномы включают раковые новообразования желудочно-кишечного тракта, такие как колоректальный рак, рак поджелудочной железы, желудка и пищевода. Колоректальный рак возникает в толстой кишке или в прямой кишке. Почти во всех случаях колоректальный рак начинается в виде доброкачественных полипов, которые в течение ряда лет перерождаются в раковые образования. В большинстве случаев колоректальный рак протекает бессимптомно. Панкреатический рак представляет собой злокачественное поражение поджелудочной железы. Его симптомы включают боль в животе, потерю аппетита, значительную потерю веса и безболезненную желтуху. Рак желудка, также называемый желудочным раком, может развиваться в любой части желудка и может распространяться на весь желудок и другие органы; в частности, на пищевод и тонкую кишку. Он также может метастазировать через стенку желудка в соседние лимфатические узлы и органы, такие как печень, поджелудочную железу и легкие, или в отдаленные органы, например в надключичные лимфатические узлы, толстую кишку и яичники. Рак желудка часто является бессимптомным. Рак пищевода представляет собой злокачественное поражение пищевода. Его симптомы включают дисфагию (затрудненное глотание), боль и значительную поте-

рю веса.

Карциномы легких представляют собой раковые заболевания легких, характеризующиеся наличием злокачественных опухолей. Существует два основных типа рака легкого: немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого. Симптомы зависят от конкретного типа рака, но могут включать хронический кашель, кровохарканье, одышку, хрипы, боль в груди, потерю аппетита, потерю веса и утомляемость.

Карциномы мочеполового тракта включают без ограничения рак простаты, рак мочевого пузыря, рак эндометрия, цервикальный рак и рак яичника. Рак простаты охватывает злокачественные опухолевые новообразования предстательной железы. Его симптомы могут включать частое мочеиспускание, затрудненное начало мочеиспускания и поддержание равномерности потока мочи, кровь в моче, болезненное мочеиспускание, затрудненное достижение эрекции или болезненную эякуляцию. Рак мочевого пузыря подразумевает любой из нескольких типов злокачественных новообразований мочевого пузыря. Его симптомы включают кровь в моче, частое мочеиспускание, болезненное мочеиспускание и недержание мочи. Эндометриальный рак охватывает злокачественные новообразования эндометрия (оболочки матки). В основном он возникает после наступления менопаузы и проявляется влагалищным кровотечением. Цервикальный рак представляет собой злокачественную опухоль шейки матки. Ранние стадии цервикального рака могут быть полностью бессимптомными. Влагалищное кровотечение может указывать на наличие злокачественной опухоли. В последующих стадиях могут появляться метастазы в желудке, легких или в другой локализации. Рак яичников представляет собой злокачественное новообразование яичников. Симптомы рака яичников являются часто нечеткими и неспецифическими, и включают неясный дискомфорт внизу живота, ощущение тяжести в тазовой области, нарушение менструального цикла, влагалищное кровотечение, увеличение веса или потерю веса, неспецифические желудочно-кишечные симптомы.

Злокачественные новообразования яичников являются источником распространения раковых клеток, которые часто имплантируются в матку, мочевой пузырь, кишку и в оболочки кишечной стенки. Эти раковые клетки могут давать начало новому опухолевому образованию прежде, чем возникнет предположение о раке.

Базальноклеточная карцинома представляет собой медленно растущую опухоль кожи, охватывающую злокачественные изменения базальных клеток кожи. Её симптомы включают поражение участков кожи, расположенных на лице, ухе, шее, груди, спине или волосистой части головы; видимые кровеносные сосуды на пораженных или смежных участках кожи; и постоянные, незаживающие раны. Этот тип рака обычно остается локальным и почти никогда не метастазирует в отдаленные части организма, но его рост может продолжаться и инвазировать соседние ткани и структуры, включающие нервы, кости и головной мозг.

Волосатоклеточный лейкоз представляет собой рак лимфоцитов (В-клеток), который приводит к снижению количества форменных элементов крови. Болезнь вызывается В-клетками аномальной формы с волосообразной конфигурацией. Симптомы часто неопределенны. Снижение количества форменных элементов, вызванное волосатоклеточным лейкозом, может приводить к инфекциям, утомляемости и обильным чрезмерным кровотечениям.

#### 4. Наследственное воспалительное заболевание, связанное с амилоидозом AA-типа.

Семейная средиземноморская лихорадка является наследственной патологией, характеризующейся рекуррентным повышением температуры и воспалением, часто с вовлечением брюшной полости или легких. Симптомы включают воспаление плевры брюшной полости, воспаление грудной клетки, кожи или суставов, наряду с высокой температурой, обычно достигающей максимального подъема через 12-24 часа. Приступы лихорадки могут варьировать по степени тяжести симптомов, и между приступами у людей обычно отсутствует симптоматика. Это заболевание является очень редким. Факторы риска включают наличие в семейном анамнезе семейной средиземноморской лихорадки или происхождение из Средиземноморского региона.

#### 5. Лимфопролиферативные заболевания, связанные с амилоидозом AA-типа.

Болезнь Кастлемана является формой лимфопролиферативного заболевания с характерной патологической гигантской гиперплазией лимфатического узла с инфильтрацией плазматическими клетками.

У пациентов с болезнью Кастлемана обычно выявляют лихорадку, анемию, гипергаммаглобулинемию и повышенную концентрацию в сыворотке белков - острофазовых средств, и все из перечисленных симптомов обусловлены большим количеством IL- 6, который продуцируется в лимфатических узлах.

### IV. Сывороточный амилоид А-типа

#### 1. Человеческий сывороточный амилоид А-типа.

Сывороточный амилоид А-типа (SAA) является циркулирующим предшественником амилоидного белка А-типа, фибриллярным компонентом амилоидных депо. Структурные исследования показали, что человеческий SAA является гетерогенным и представляет семейство полиморфных генов SAA и белковых продуктов. Суперсемейство генов SAA содержит группу близко связанных генов, локализованных в 11p15.1. См. Sellar, G.C. et al. Genomics 19:221-227 (1994). У людей описаны четыре гена SAA. Типичные аминокислотные последовательности белков, кодируемых четырьмя указанными генами SAA, показаны

на фиг. 1. Два гена (SAA1 и SAA2) кодируют сывороточный острофазовый амилоид (A-SAA), и их стимуляция является согласованным ответом на воспаление.

Последовательности SAA1 и SAA2 обладают 95% идентичностью как в кодирующих, так и в некодирующих областях. Существуют альфа-, бета- и гамма-изоформы человеческого SAA1 и альфа- и бета-изоформы человеческого SAA2, как показано на фиг. 18 и 19. SAA3 является псевдогеном. SAA4 кодирует конститутивный SAA и имеет минимальную индуцибельность. См. публикации Cunnane G. *Bailliere's Clin. Rheumatol.* 13(4):615-628. Все человеческие молекулы SAA/AA несут теоретическую кальций-связывающую тетрапептидную последовательность Gly-Pro-Gly-Gly, которая при фибриллогенезе возможно имеет значение для самоагрегации и для агрегации с экстрафибрилярными остатками амилоида. См. публикации Fykse, E.M. et al. *Biochem. J.* 256:973-980 (1988) и Turnell et al. *Mol. Biol. Med.* 3:387-407 (1986). N-концевой участок SAA/AA обладает мощной гидрофобностью, вероятно, важной для самоагрегации и с другими компонентами в амилоидных депозитах. См. Husby et al. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70(1):2-9 (1994). На фиг. 2-5 показаны последовательности каждой из изоформ AA и их отношение к соответствующей изоформе SAA. Например, человеческая альфа-изоформа SAA1 имеет последовательность:

H<sub>2</sub>N-Met-Lys-Leu-Leu-Thr-Gly-Leu-Val-Phe-Cys-Ser-Leu-Val-Leu-Gly-Val-Ser-Ser-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-Leu-Ala-Asp-Gln-Ala-Ala-Asn-Glu-Try-Gly-Arg-Ser-Gly-Lys-Asp-Pro-Asn-His-Phe-Arg-Pro-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Lys-Tyr-OH (SEQ ID NO:1).

AA, который является протеолитическим фрагментом SAA, также является гетерогенным. Преобладающий человеческий пептид AA состоит из 76 аминокислот. Пример AA имеет следующую аминокислотную последовательность:

H<sub>2</sub>N-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-OH (SEQ ID NO:2).

Остатки 70-76 из AA относятся к фрагменту AA в последовательности (SEQ ID NO: 2), начинающемуся с остатка 70 и заканчивающегося остатком 76, который состоит из последовательности GHGAEDS (SEQ ID NO: 4) или из соответствующего сегмента другого природного человеческого AA-белка или AA-белка других видов, при этом аминокислотная последовательность указанного белка имеет максимальное выравнивание с SEQ ID NO: 2.

## 2. Мышиный сывороточный амилоид А.

У мышей описаны четыре гена SAA. Типичные аминокислотные последовательности белков, кодируемые четырьмя мышиными генами SAA, показаны на фиг. 8. Генное семейство мышиных SAA содержит четыре члена, которые тесно связаны в хромосоме 7. Два из этих генов, кодирующих основные мышиные изоформы SAA (SAA1 и SAA2), имеют высокоидентичные последовательности не только в экзонах, но также и в интронах и фланкирующих областях и в ответ на амилоидную индукцию в моделях индуцируются примерно в равных количествах. Указанные два изоформа отличаются только по 9 аминокислотным остаткам из 103; однако только SAA2 селективно депонируется в амилоидные фибриллы. См. публикации de Beer M.C. *Biochem J.* 1991 280 (Pt 1):45-49 (1991); Hoffman J.S. et al. *J. Exp. Med.* 159:641-646 (1984); Shiroo M. et al. *Scand. J. Immunol.* 26:709-716 (1987). SAA3 представляет собой минорный аполипопротеин ЛВП и периферически продуцируемый острофазовый белок. SAA4 является конститутивным субсемейством, которое представляет собой минорный нормальный аполипопротеин ЛВП, содержащий более 90% SAA для поддержания гомеостаза. См. публикации Stearman R.S. et al. *Nucleic Acids Research*, 14(2):797-809 (1986) и de Beer M.C. *Genomics*, 34(1):139-42 (1996).

Мышиный AA, который представляет собой протеолитический фрагмент SAA, также является гетерогенным. Аминокислотные последовательности каждой из мышиных SAA-изоформ показаны на фиг. 9-12. Выравнивание мышиных последовательностей AA1, AA2, AA3 и AA4 показано на фиг. 13. Мышиный AA1 представляет собой мышиный эквивалент человеческого AA1, см. фиг. 16. В частности, остатки 69-75 из мышиных последовательностей AA1 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9) имеют максимальное выравнивание с остатками 70-76 человеческих AA1 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4), см. также фиг. 17.

## 3. Сывороточный А-амилоид шарпея.

Аминокислотная последовательность шарпея показана на фиг. 20. Интересно, что гомологичный участок в человеческом белке SAA-AEDS (SEQ ID NO: 13) несет консервативную замену Thr на Ser в положении 76, а также в значительной степени отличающуюся боковую цепь остатка в положении 73 (замена His на Ala; фиг. 1). Последовательность AEDS (SEQ ID NO: 13) также обнаруживают у собак породы шарпей, при этом указанная порода особенно восприимчива к АА-амилоидозу и может являться естественной моделью системного АА-амилоидоза, с помощью которой можно оценивать новые диагностические и терапевтические применения амилоид-специфических АА-антител и других соединений.

## 4. N-концевой сегмент АА-белка определяет его фибриллогенные свойства.

Амилоидный фибриллярный белок АА состоит из варибельной длинной части N-концевого сывороточного АА-белка-предшественника. Подтверждено, что амилоидогенная часть молекулы представляет собой N-концевой сегмент длиной от 10 до 15 аминокислот. Аминокислотные замены в этой части молекулы могут объяснить, почему только одна из двух мышинных изоформ SAA является амилоидогенной. См. Westermarck G.T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182(1):27-33 (1992).

**V. Другие человеческие амилоидогенные белки**

В табл. 3 представлены инвентарные номера в банке генов Genbank и последовательности X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> для нескольких человеческих амилоидогенных белков, включающих некоторые из перечисленных выше белков из табл. 2.

Таблица 3

Человеческие амилоидогенные белки

Человеческие амилоидогенные белки	Консенсусная последовательность	Инвентарные номера в банке генов Genbank
SAA1	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA2	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA3	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
SAA4	AEDS, (SEQ ID NO: 13)	
Область легкой цепи анти-Sm иммуноглобулина-каппа; цепь моноклонального антитела 4B4-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAВ26897
Варибельный участок, задействованный в легкой цепи иммуноглобулина-каппа ITC52 (подгруппа V каппа III)	PEDS, (SEQ ID NO: 26)	AAС61608
Варибельный участок, задействованный в легкой цепи иммуноглобулина-каппа ITC48 (подгруппа V каппа IV)	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAС61606
Предшественник легкой цепи анти-RhD моноклонального T125-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAW82027
Предшественник легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	CAA45496
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAТ44350

Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAТ44349
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAТ44348
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	CAA09185
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	CAA09181
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAU14891
Легкая цепь антирабического иммуноглобулина-каппа SOJA	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAO17825
Вариабельный участок легкой цепи антистрептококкового/антимизинового иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAВ68786
Вариабельный участок легкой цепи антистрептококкового/антимизинового иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAВ68785
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа против человеческого лейкоцитарного антигена HLA-A2/анти-HLA-A28	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAС99644
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа; против ДНК антитела 18/2	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAВ62946
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF75949
Легкая цепь иммуноглобулина 48d каппа против вируса иммунодефицита человека HIV-1gp120	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAР88370

Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	PEDL, (SEQ ID NO: 27)	BAA97671
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа против <i>Entamoeba histolytica</i>	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA82105
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа против <i>Entamoeba histolytica</i>	TEDV, (SEQ ID NO: 28)	BAA82102
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAC41705
Вариабельный участок легкой цепи моноклонального Ig (иммуноглобулина)-каппа против GM2 ганглиозидного ДНК	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAC26480
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа; против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV	PEDV, (SEQ ID NO: 151)	AAT51719
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа; против SARS-CoV	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAT51718
VLJ участок (соединительный участок легкой цепи) иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAD27502
VLJ участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	BAD27497
Легкая цепь иммуноглобулина 47е каппа против HIV-1gp120	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAR88378
Легкая цепь иммуноглобулина 16с каппа против HIV-1gp120	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAR88374



Легкая цепь иммуноглобулина 411g каппа против HIV-1gp120	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAR88372
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14212
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14211
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14210
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAF14209
V (варибельный) участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	AAR02415
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAM46647
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAM46643
Легкая цепь иммуноглобулина-каппа против <i>Entamoeba histolytica</i>	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA82103
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65723
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65718
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAL65717
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAL65716
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65714
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65713

Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65712
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65711
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65710
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	LEDG, (SEQ ID NO: 31) PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65709
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	LEDG, (SEQ ID NO: 31) PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65708
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65707
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65706
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65705
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65704
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAL65703
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAC64146
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	AAC64144
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	ABI64139
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL04535
Варибельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65722

Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAL65720
V-J (вариабельный соединительный) участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19563
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19562
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19561
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19560
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19559
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	BAA19558
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	BAA19556
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	AAA71907
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA71905
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина G1 Fab	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	BAF49281
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина G1 Fab	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48998
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина G1 Fab	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48996
V-участок легкой цепи каппа	AEDM, (SEQ ID NO: 32)	CAA37675
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина G1 Fab	SEDF, (SEQ ID NO: 24)	BAF48994
Вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина G1 Fab	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAF48992
V-J-C участок цепи предшественника Ig-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A53261

V-участок цепи предшественника Ig-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A49137
V-I участок цепи предшественника Ig-каппа	SEDI, (SEQ ID NO: 29)	PN0445
V-III участок цепи предшественника Ig-каппа (EVI-15)	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	A32274
V-IV участок (Dep) цепи Ig-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	A34153
V-IV участок (Fue) цепи Ig-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	B34153
V-II участок (Pec) цепи Ig-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	C34153
Цепь L (легкая) Fab-фрагмента Ig-g (связывание Cd25)	AEDA, (SEQ ID NO: 62)	1M1M_L
Цепь H (тяжелая) Fab-фрагмента Ig-g (связывание Cd25)	HEDS, (SEQ ID NO: 33)	1M1M_H
C - область цепи Ig-мю, секреторируемая сплайс-форма	CEDD, (SEQ ID NO: 34)	MNHU
V-J участок цепи иммуноглобулина-каппа	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA58923
Вариабельный участок легкой цепи рекомбинантного моноклонального антитела IgM 12 каппа	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	ABA41551
Легкая цепь иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	CAA65054
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65769
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65767
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAL65765

Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	TEDE, (SEQ ID NO: 16)	AA165764
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AA165763
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AA165762
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AA165761
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AA165760
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AA165759
Вариабельный участок легкой цепи лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AA165758
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19563
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19562
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	BAA19561
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19560
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDF, (SEQ ID NO: 22)	BAA19559
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	BAA19558
V-J участок легкой цепи иммуноглобулина	PEDI, (SEQ ID NO: 21)	BAA19556
Вариабельный участок легкой цепи 30-лямбда иммуноглобулина	AEDE, (SEQ ID NO: 19)	AAK95335

Прогноз: сходный с низкоаффинным иммуноглобулином-гамма, Fc- участок рецептора II-a предшественника (Fc-гамма RII-a) (FcRII-a) (IgG Fc- рецептор II-a) (Fc-гамма- RIIa) (антиген CD32) (CDw32)	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	XP_001129584
Fc-фрагмент IgG, высокоаффинный Ia, рецептор (CD64)	REDS, (SEQ ID NO: 36) TEDG, (SEQ ID NO: 37) QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_000557
Fc-фрагмент IgG, низкоаффинный IIb, рецептор для (CD32), изоформа 2	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002273 XP_943944
Fc-фрагмент IgG, низкоаффинный IIb, рецептор для (CD32), изоформа 1	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_003992
Fc-фрагмент IgG, низкоаффинный IIb, рецептор для (CD32), изоформа 4	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002275
Fc-фрагмент IgG, низкоаффинный IIb, рецептор для (CD32), изоформа 3	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_001002274 XP_001129592
Fc-фрагмент IgG, высокоаффинный Ib, рецептор для (CD64), изоформа a	QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_001017986
Fc-фрагмент IgG, высокоаффинный Ib, рецептор для (CD64), изоформа b	QEDR, (SEQ ID NO: 38)	NP_001004340 XP_496386

Fc-фрагмент низкоаффинный IIa, рецептор для (CD32)	IgG,	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	NP_067674 XP_943942
Низкоаффинный иммуноглобулин-гамма, участок рецептора III-b предшественника	Fc-	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	NP_000561
Fc-фрагмент низкоаффинный рецептор для (CD16)	IgG, III-a,	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	NP_000560 XP_001133750
Низкоаффинный иммуноглобулин-гамма, участок рецептора II-a предшественника (Fc-гамма RII-a) (FcRII-a) (IgG Fc- рецептор II-a) (Fc-гамма- RIIa) (антиген CD32) (CDw32)	Fc-	QEDS, (SEQ ID NO: 35)	P12318
Низкоаффинный иммуноглобулин-гамма, участок рецептора III-B предшественника (IgG Fc- рецептор III-1) (Fc-гамма- RIII-бета) (Fc-гамма RIIIb) (FcRIIIb) (Fc-гамма-RIII) (Fc-RIII) (FcR-10) (антиген CD16b)	Fc-	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	075015

Низкоаффинный иммуноглобулин-гамма, Fc- участок рецептора III-A предшественника (IgG Fc- рецептор III-2) (Fc-гамма- RIII-альфа) (Fc-гамма- RIIIa) (FcRIIIa) (Fc-гамма- RIII) (Fc-RIII) (FcR-10) (антиген CD16a)	TEDL, (SEQ ID NO: 39) PEDN, (SEQ ID NO: 40) EEDP, (SEQ ID NO: 41)	P08637
Высокоаффинный иммуноглобулин-гамма, Fc- участок рецептора I предшественника (Fc-гамма- RI) (Fc-RI) (IgG Fc- рецептор I) (антиген CD64)	REDS, (SEQ ID NO: 36) TEDG, (SEQ ID NO: 37) QEDR, (SEQ ID NO: 38)	P12314
Постоянная тяжелая цепь иммуноглобулина IGHG1 гамма1 (G1m маркер)	AEDT, (SEQ ID NO: 14)	Q6PJA4
apoA1 ( <i>Homo sapiens</i> )	LEDL, (SEQ ID NO: 42)	CAA01253
Предшественник аполипопротеина C-III ( <i>Homo sapiens</i> )	AEDA, (SEQ ID NO: 62)	NP_000031
Предшественник аполипопротеина A-IV ( <i>Homo sapiens</i> )	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	NP_000473
Гельсолин (амилоидоз, финский тип) ( <i>Homo sapiens</i> )	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QEDL, (SEQ ID NO: 63)	CAM20459



Гельсолин (амилоидоз, финский тип) ( <i>Homo sapiens</i> )	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QEDL, (SEQ ID NO: 63)	CAI14413
Гельсолин (амилоидоз, финский тип), изоформа CRA_c ( <i>Homo sapiens</i> )	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QEDL, (SEQ ID NO: 63)	EAW87491
Гельсолин (амилоидоз, финский тип), изоформа CRA_b ( <i>Homo sapiens</i> )	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QEDL, (SEQ ID NO: 63)	EAW87490
Гельсолин (амилоидоз, финский тип), изоформа CRA_a ( <i>Homo sapiens</i> )	TEDT, (SEQ ID NO: 30) KEDA, (SEQ ID NO: 43) SEDC, (SEQ ID NO: 44) QEDL, (SEQ ID NO: 63)	EAW87489
Амилоидный белок-предшественник; APP ( <i>Homo sapiens</i> )	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAB23646

Амилоидный белок-предшественник; APP ( <i>Homo sapiens</i> )	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAB19991
Амилоидный белок	AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAA51768
Белок-предшественник амилоид-бета A4 (APP) (ABPP) (амилоидный белок болезни Альцгеймера) (церебральный васкулярный амилоидный пептид) (CVAP) (протеаза nexin-II) (PN-II) (APPI) (PreA4) [содержит: растворимый APP-альфа (S-APP-альфа); растворимый APP-бета (S-APP-бета); C99; бета-амилоидный белок 42 (бета-APP42); бета-амилоидный белок 40 (бета-APP40); C83; P3(42); P3(40); гамма-CTF(59) (С-концевой фрагмент 59 гамма-секретазы) (амилоидный внутриклеточный домен 59) (AID(59)) (AICD-59); гамма-CTF(57) (С-концевой фрагмент 57 гамма-секретазы) (амилоидный внутриклеточный домен 57) (AID(57)) (AICD-57); гамма-CTF(50) (С-концевой фрагмент 50 гамма-секретазы) (амилоидный внутриклеточный домен 50) (AID(50)) (AICD-50); C31]	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48) AEDV, (SEQ ID NO: 23)	P05067

Белок APP ( <i>Homo sapiens</i> )	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48)	AAH65523
Белок APP ( <i>Homo sapiens</i> )	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48)	AAH04369
Белок-предшественник амилоид-бета A4 (протеаза pexin-II, болезнь Альцгеймера) ( <i>Homo sapiens</i> )	EEDD, (SEQ ID NO: 45) SEDK, (SEQ ID NO: 46) DEDD, (SEQ ID NO: 47) DEDG, (SEQ ID NO: 48) AEDV, (SEQ ID NO: 23)	AAW82435
Кальцитонин	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA58403
Предшественник кальцитонина	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA35501
Препрокальцитонин ( <i>Homo sapiens</i> )	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	CAA25103
Препрокальцитонин	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	AAA51913

Предшественник кальцитонина [содержит: кальцитонин; катакальцин (кальцитониновый карбокси- концевой пептид) (CCP) (PDN-21)]	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	P01258
Изоформа кальцитонина препропротеин CALCA ( <i>Homo sapiens</i> )	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001029124
Изоформа кальцитонина препропротеин CALCA ( <i>Homo sapiens</i> )	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001732
Изоформа кальцитонина препропротеин CGRP ( <i>Homo sapiens</i> )	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	NP_001029125
Предшественник кальцитонинового генно- родственного пептида 1 (кальцитониновый генно- родственный пептид 1) (CGRP-I) (CGRP альфа-типа)	SEDE, (SEQ ID NO: 18)	P06881
Атриальный натрийуретический фактор	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	AAA35528
Пропептид атриального натрийуретического фактора ( <i>Homo sapiens</i> )	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	CAA25700
Атриальный натрийуретический фактор	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	1101403A

## 036059

Предшественник атриального натрийуретического фактора (ANF) (атриальный натрийуретический пептид) (ANP) (препронатрийдилатин) (CDD-ANF) [содержит: кардиодилатин-родственный пептид (CDP)]	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	P01160
Атриальный натрийуретический пептид	LEDE, (SEQ ID NO: 49)	AAA35529
Кератин ( <i>Homo sapiens</i> )	GEDA, (SEQ ID NO: 50)	AAB30058
Кератин ( <i>Homo sapiens</i> )	VEDF, (SEQ ID NO: 51) YEDE, (SEQ ID NO: 52)	CAA3 1695
Кератин	IEDL, (SEQ ID NO: 53) GEDA, (SEQ ID NO: 50)	AAB59562
Кератин, цитоскелетный 6C II типа (цитокератин-6C) (СК 6C) (К6с кератин) (цитокератин-6E) (СК 6E) (кератин K6h)	VEDL, (SEQ ID NO: 64) YEDE, (SEQ ID NO: 52) LED A, (SEQ ID NO: 65)	P48668
Фибриноген ( <i>Homo sapiens</i> )	WEDY, (SEQ ID NO: 54)	CAA50740

## 036059

Предшественник фибриногена, альфа-субъединица ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66) LEDW, (SEQ ID NO: 58)	AAC97142
Фибриноген альфа-цепь ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	AAI01936
Фибриноген альфа-цепь ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	AAH98280

Фибриноген альфа-цепь, изоформа CRA_b ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66) LEDW, (SEQ ID NO: 58)	EAX04926
Фибриноген альфа-цепь, изоформа CRA_c ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56) YEDQ, (SEQ ID NO: 57) SEDG, (SEQ ID NO: 66)	EAX04928
Фибриноген альфа-цепь, изоформа CRA_a ( <i>Homo sapiens</i> )	DEDW, (SEQ ID NO: 55) SEDL, (SEQ ID NO: 56)	EAX04924
Предшественник прионного белка; PRNP [ <i>Homo sapiens</i> ]	YEDR, (SEQ ID NO: 59)	AAC62750
Основной предшественник прионного белка (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C (ASCR) (антиген CD230)	YEDR, (SEQ ID NO: 59)	P04156
Предшественник прионного белка [ <i>Homo sapiens</i> ]	YEDR, (SEQ ID NO: 59)	NP_000302
Пролактин [ <i>Homo sapiens</i> ]	PEDK, (SEQ ID NO: 60)	CAA 38264
Пролактин [ <i>Homo sapiens</i> ]	PEDK, (SEQ ID NO: 60)	AAH88370

#### VI. Амилоидные пептиды для активной иммунизации

Терапевтические средства, применяемые в способах по настоящему изобретению, представляют собой иммуногенные пептиды, такие как пептиды AA-типа и пептиды AL-типа, которые при введении пациенту создают антитела, специфически связывающиеся с одним или несколькими эпитопами, содержащими X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, например с такими, как эпитопы между остатками 70-76 AA ("AA-средства"). Дополнительные примеры средств включают иммуногенные пептиды, которые содержат фрагмент, состоящий из X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, полученного из других амилоидных белков ("фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>"), такие как AL-фрагменты V<sub>k</sub>, состоящие из аминокислотных последовательностей PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25), и AL-фрагменты V<sub>λ</sub>, состоящие из аминокислотных последовательностей SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), TEDE (SEQ ID NO: 16) или PEDE (SEQ ID NO: 20). Также может использоваться AL-фрагмент V<sub>λ</sub>, состоящий из аминокислотной последовательности FEDD (SEQ ID NO: 17). Некоторые подходящие амилоидные белки включают сывороточный A-амилоидный белок, белок легкой цепи иммуноглобулина, человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR), ApoA1 и другие амилоидные белки, перечисленные в табл. 1, которые содержат аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. В некоторых средствах X<sub>1</sub> представляет собой H, T, F, S, P, A или любой другой аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий ED в амилоидном белке; и X<sub>2</sub> представляет собой T, S, E, R, I, V, F, D, A или любой другой аминокислотный остаток, расположенный непосредственно после ED в таком амилоидном белке. В некоторых средствах X<sub>1</sub> представляет собой H, T, F, S, P или A и X<sub>2</sub> является T, S, E, D, R, I, V, F или A. Если X<sub>1</sub> в некоторых указанных средств-

вах представляет собой H, то  $X_2$  является T или A; если  $X_1$  представляет собой A, то  $X_2$  является S, T, E или V; если  $X_1$  представляет собой T, то  $X_2$  является E; если  $X_1$  представляет собой F, то  $X_2$  является D; если  $X_1$  представляет собой S, то  $X_2$  является E, F или A; и если  $X_1$  представляет собой P, то  $X_2$  является E, I или F. В некоторых случаях  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P или A и  $X_2$  является T, S, E, D, R, I, V, F или A, при условии, что если  $X_1$  представляет собой A, то  $X_2$  не является V. Если  $X_1$  в некоторых случаях представляет собой A, то  $X_2$  является S, T или E.

Некоторые средства содержат аминокислотную последовательность GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые средства состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25), которые связаны с носителем для образования конъюгата.

Некоторые средства содержат аминокислотные последовательности GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые средства состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25), которые связаны с носителем для образования конъюгата.

Некоторые средства содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Предпочтительными AA-фрагментами являются остатки 70-76 альфа-изоформы человеческой AA1 (HAA1) (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4), остатки 70-76 бета-изоформы HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), остатки 70-76 гамма-изоформы HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), остатки 70-76 альфа- и бета-изоформ HAA2 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4), остатки 70-76 HAA3 (GDHAEDS, SEQ ID NO: 7), остатки 78-84 HAA4 (STVIEDS, SEQ ID NO: 8), остатки 69-75 мышинной AA1 (MAA1) (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), остатки 69-75 MAA2 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), остатки 62-68 MAA3 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10) и остатки 76-82 MAA4 (NHGLETL, SEQ ID NO: 11) или субфрагменты по меньшей мере из трех смежных аминокислот любого из указанных остатков. Некоторые AA-фрагменты не содержат остатков AA-амилоидного пептида, кроме обозначенного выше сегмента. Другие AA-фрагменты содержат дополнительные фланкирующие остатки AA-амилоидного пептида, но содержат всего не более 20, или предпочтительно не более 10 смежных остатков из AA-амилоидного пептида. Дополнительные предпочтительные фрагменты  $X_1EDX_2$  и AL-типа включают GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Терапевтические средства для применения в способах по настоящему изобретению также включают иммуногенные AA-пептиды, которые при введении пациенту создают антитела, специфически связывающиеся с N-концевыми эпитопами AA. Предпочтительные средства индуцируют иммуногенный ответ, направленный на эпитоп в пределах 1-15 остатков человеческих AA-пептидов.

Предпочтительно вводимые фрагменты AA или AL или другие средства, такие как фрагменты  $X_1EDX_2$ , содержат недостаточно эпитопов, которые будут вызывать T-клеточный ответ на фрагмент. В общем T-клеточные эпитопы имеют более 10 смежных аминокислот. Поэтому предпочтительные фрагменты амилоидных белков, такие как AA или фрагменты  $X_1EDX_2$ , имеют размер от 4 до 10 или предпочтительно от 7 до 10 смежных аминокислот; т.е. обладают достаточной длиной для индукции ответа антитела, без генерации ответа T-клеток. Отсутствие T-клеточных эпитопов является предпочтительным, поскольку указанные эпитопы не являются необходимыми для иммуногенного действия фрагментов, и они могут вызывать нежелательную воспалительную реакцию у подгрупп пациентов (Anderson et al., (2002) J. Immunol. 168, 3697-3701; Senior (2002), Lancet Neurol. 1, 3).

Предпочтительными AA-фрагментами являются остатки 70-76 альфа изоформы человеческого AA1 (HAA1) (GHGAEDS) (SEQ ID NO: 4), остатки 70-76 бета изоформы HAA1 (GHDAEDS) (SEQ ID NO: 5), остатки 70-76 гамма изоформы HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), остатки 70-76 альфа- и бета-изоформ HAA2 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 4), остатки 70-76 HAA3 (GDHAEDS) (SEQ ID NO: 7), остатки 78-84 HAA4 (STVIEDS) (SEQ ID NO: 8), остатки 69-75 мышинного AA1 (MAA1) (GRGHEDT) (SEQ ID NO: 9),



остатки 69-75 MAA2 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), остатки 62-68 MAA3 (GHGAEDS) (SEQ ID NO: 10) и остатки 76-82 MAA4 (NHGLETL) (SEQ ID NO: 11) или субфрагменты по меньшей мере из трех смежных аминокислот любого из указанных остатков. Некоторые фрагменты AA не содержат остатков амилоидного AA-пептида, кроме обозначенного выше сегмента. Другие AA-фрагменты AA содержат дополнительные фланкирующие остатки амилоидного AA-пептида, но содержат всего не более 20, или предпочтительно, не более 10 смежных остатков амилоидного AA-пептида. Дополнительные предпочтительные фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> и AL включают GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Для индукции иммунного ответа в способах и композициях по настоящему изобретению можно также использовать аналоги AA-амилоидного, AL-амилоидного и других амилоидных пептидов природного происхождения. Аналоги включают аллельные, видовые варианты и варианты индуцирования. Аналоги AA-пептида индуцируют антитела, которые специфически связываются с AA-пептидом остатков 70-76 природного происхождения. Некоторые такие аналоги не способны индуцировать антитела, которые специфически связываются с эпитопами вне остатков 70-76 в AA-пептиде. Обычно отличия аналогов AA от пептидов природного происхождения составляют до 30% положений аминокислот, и указанные отличия заключаются в заменах до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или до 10 положений. Каждая делеция или замена аминокислотного остатка природного происхождения считается заменой положения в виде вставки остатка без замены. Замены аминокислот часто представляют собой консервативные замены.

Некоторые аналоги AA или AA-фрагментов AL или AL-фрагментов или других амилоидных фрагментов белка, таких как фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, также включают аминокислоты искусственного происхождения или модификации N-концевых или C-концевых аминокислот в первом, втором, пятом, десятом или даже во всех положениях. Например, остаток аспарагиновой кислоты природного происхождения можно заменить на изоаспарагиновую кислоту. Примерами аминокислот искусственного происхождения являются D, альфа, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота, 4-гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат, эpsilon-N,N,N-триметиллизин, эpsilon-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, омега-N-метиларгинин, β-аланин, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, тироксин, гамма-аминомасляная кислота, гомосерин, цитруллин и изоаспарагиновая кислота. Некоторые терапевтические средства по изобретению представляют собой полностью-D пептиды, например полностью-D AA или полностью-D фрагменты AA, и полностью-D пептидные аналоги. Некоторые терапевтические средства по изобретению на 90% являются полностью-D пептидами, например на 90% полностью-D AA или на 90% полностью-D фрагментами AA, и на 90% полностью-D пептидными аналогами. Некоторые терапевтические средства по изобретению на 80% являются полностью-D пептидами, например на 80% полностью-D AA или на 80% полностью-D фрагментами AA, и на 80% полностью-D пептидными аналогами. Можно проводить скрининг фрагментов и аналогов на профилактическую или терапевтическую эффективность с помощью трансгенных моделей животных по сравнению с контролем без лечения или плацебо, как описано ниже.

Пептиды AA, AL, их фрагменты и аналоги и фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> и их аналоги можно синтезировать путем твердофазного синтеза пептидов или путем рекомбинантной экспрессии или их можно получать из источников природного происхождения. Автоматические пептидные синтезаторы являются коммерчески доступными у многочисленных поставщиков, таких как компания Applied Biosystems, Foster City, Калифорния. Рекомбинантную экспрессию можно осуществлять в бактериях, например E.coli, в дрожжах, в клетках насекомых или клетках млекопитающих. Методики рекомбинантной экспрессии описаны авторами Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2<sup>nd</sup> ed., 1989).

Терапевтические средства также включают более длинные полипептиды, которые включают, например, иммуногенный фрагмент AA-пептида, AL-пептида или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, вместе с одной или больше другими аминокислотами, фланкирующими AA-пептид, AL-пептид или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> на одной стороне или на одной или обеих сторонах. Например, предпочтительные средства включают слитые белки, содержащие сегмент AA, AL или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, слитый с гетерологичной аминокислотной последовательностью, которые индуцируют T-клеточный ответ против гетерологичной аминокислотной последовательности и, таким образом, B-клеточный ответ против сегмента AA, сегмента AL или фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Также можно использовать одну или больше фланкирующих гетерологичных аминокислот, чтобы накрыть пептиды AA или AL или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> для защиты от их разрушения при изготовлении, хранении или применении. С помощью животных моделей можно проводить скрининг указанных полипептидов на их профилактическую или терапевтическую эффективность по сравнению с контролем без лечения или плацебо, как описано ниже. Терапевтические средства по изобретению включают иммуногенный фрагмент AA или AL или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> между последовательностями полилизина. Последовательности полилизина можно сливать с N-концом, C-концом или с N-концом и C-концом AA или AL или с иммуногенным фрагментом AA или AL, или с фрагментом X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Пептиды AA или AL, фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, аналог, активный фрагмент AA или другого полипептида можно вводить в связанной или мультимерной форме или в диссоциированной форме.

Терапевтические средства также включают мультимеры мономерных иммуногенных средств.

В дополнительных вариантах иммуногенный фрагмент AA или AL или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> могут быть представлены вирусом или бактерией в виде части иммуногенной композиции. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуногенный пептид, вставлена в геном или эписому вируса или бактерий. Необязательно, нуклеиновая кислота вставлена таким образом, что иммуногенный пептид экспрессируется в виде секретируемого белка или в виде белка, слитого с белком внешней оболочки вируса или с трансмембранным белком бактерии, для фенотипирования пептида. Вирусы или бактерии, используемые в таких способах, должны быть непатогенными или аттенуированными. Подходящие вирусы включают аденовирус, вирус простого герпеса HSV, вирус венецианского лошадиного энцефалита и другие альфа-вирусы, вирус везикулярного стоматита и другие рабдовирусы, возбудители вакцинии и оспы птиц. Подходящие бактерии включают *Salmonella* и *Shigella*. Особенно подходит слияние иммуногенного пептида с поверхностным антигеном вируса гепатита В HBsAg HBV.

Терапевтические средства также включают пептиды и другие соединения, которые необязательно имеют аминокислотные последовательности, в значительной степени подобные AA или AL или фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, но тем не менее являются миметиками AA или AL или фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> и индуцируют сходный иммунный ответ. Например, можно проводить скрининг на применимость любых пептидов и белков, образующих β-складчатые листы. Также можно использовать антиидиотипические антитела против моноклональных антител к AA или AL или к другим амилоидогенным пептидам, например фрагментам X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Такие анти-Id (антиидиотипические) антитела подражают антигену и создают иммунный ответ на него (см. *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6<sup>th</sup> ed), p. 181). Другие средства, кроме AA-пептидов, должны индуцировать иммуногенный ответ против одного или больше предпочтительных сегментов AA, упомянутых выше (например, AA 70-76 или GHEDT (SEQ ID NO: 3) или упомянутого выше фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, такого как, например, HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Предпочтительно, что такие средства индуцируют иммуногенный ответ, который специфически направлен на один из указанных сегментов и при этом не направлен на другие сегменты AA или AL или амилоидного белка, из которого происходит фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>.

Также можно проводить скрининг на применимость рандомизированных библиотек пептидов или других соединений. Можно создавать комбинаторные библиотеки для многих типов соединений, которые можно синтезировать поэтапно. Такие соединения включают полипептиды, бета-варианты миметиков, полисахариды, фосфолипиды, гормоны, простагландины, стероиды, ароматические соединения, гетероциклические соединения, бензодиазепины, олигомерные N-замещенные глицины и олигокарбаматы. Большие комбинаторные библиотеки указанных соединений можно конструировать с помощью способа кодирующих синтетических библиотек (ESL), описанного в следующих источниках: Affymax, патент WO 95/12608, Affymax, патент WO 93/06121, Колумбийский университет, патент WO 94/08051, Фармакопоя, патент WO 95/35503 и Scripps, патент WO 95/30642 (каждый из которых для всех целей включен в настоящее изобретение со ссылкой). Пептидные библиотеки также можно создавать способами фаговых дисплеев. См., например, Devlin, патент WO 91/18980.

Вначале проводят скрининг комбинаторных библиотек и других соединений на применимость, путем определения способности соединений специфически связываться с антителами или лимфоцитами (B- или T-), которые достоверно специфичны для AA или других амилоидогенных пептидов. Например, начальный скрининг можно проводить с любой поликлональной сывороткой или моноклональным антителом к AA или AL или их фрагментам или к фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Можно проводить скрининг на специфическое связывание со специфическим эпитопом в пределах AA (например, остатки AA 70-76 или GHEDT (SEQ ID NO: 3) или в пределах AL или вышеупомянутого фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, такого как, например, HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Можно тестировать соединения с помощью методик, аналогичных описанным методикам картирования характеристик эпитопов антитела. Идентифицированные с помощью такого скрининга соединения затем дополнительно анализируют на способность индуцировать антитела или реактивные лимфоциты к AA или AL или их фрагментам или к фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Например, можно тестировать серийные разведения сывороток на микротитровальных планшетах с предварительным нанесением AA или AL или их фрагментов или фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, и можно проводить стандартный твердофазный иммуноферментный анализ ELISA для тестирования на реактивные антитела к AA или AL или их фрагментам или к фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Также можно тестировать соединения на профилактическую и терапевтическую эффективность у трансгенных животных, предрасположенных к амилоидозу, например, к амилоидозу AA-типа или амилоидозу AL-типа. Такой же скрининговый подход можно применять с другими потенциальными средствами, аналогами AA, аналогами AL и более длинными пептидами, включающими фрагменты AA, AL и фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, описанные выше.

## VII. Конъюгаты

Некоторые средства для индуцирования иммунного ответа содержат соответствующий эпитоп для индукции иммунного ответа на АА, но имеют слишком малый размер, чтобы обладать иммуногенными свойствами. В таком случае пептидный иммуноген может быть связан с подходящей молекулой-носителем для образования конъюгата, который способствует активации иммунного ответа. Единственное средство может быть связано с единственным носителем, множественные копии средства можно связывать с множественными копиями носителя, которые, в свою очередь, связаны друг с другом, множественные копии средства могут быть связаны с единственной копией носителя или единственная копия средства может быть связана с множественными копиями носителя или разных носителей. Подходящие носители включают альбуминовую сыворотку, гемоцианин лимфы улитки, молекулы иммуноглобулина, тироглобулин, овальбумин, токсин столбняка или токсин других патогенных бактерий, таких как дифтерия, *E.coli*, холера или *H.pilogu*, или аттенуированное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также представляют собой подходящие молекулы-носители. Некоторые конъюгаты можно создавать путем связывания средств по настоящему изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин-цистеином (Pam<sub>3</sub>Cys), маннаном (манозный полимер) или глюканом (бета 1→2 полимер)), цитокинами (например, пептиды интерлейкины IL-1, IL-1-альфа и бета, IL-2, гамма-интерферон, IL-10, гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор GM-CSF) и хемокинами (например, альфа- и бета-MIP1 и RANTES). Иммуногенные средства также могут быть связаны с пептидами, которые увеличивают транспорт через ткани, как описано автором O'Mahony в патентах WO 97/17613 и WO 97/17614. Связь иммуногенов с носителями может осуществляться со спейсерными аминокислотами (например, Gly-Gly) или без них.

Некоторые конъюгаты можно образовывать посредством связывания средств по изобретению по меньшей мере с одним Т-клеточным эпитопом. Некоторые Т-клеточные эпитопы являются промискуитетными, тогда как другие Т-клеточные эпитопы универсальны. Промискуитетные Т-клеточные эпитопы способны усиливать индукцию Т-клеточного иммунитета у широкого ряда субъектов с выявленными разными типами HLA. В отличие от промискуитетных Т-клеточных антигенных детерминант, универсальные Т-клеточные эпитопы обладают способностью усиливать индукцию Т-клеточного иммунитета в большем процентном отношении, например, по меньшей мере у 75% субъектов с выявленными разными молекулами HLA, кодируемыми разными аллелями HLA-DR.

Существует большое количество Т-клеточных эпитопов природного происхождения, таких как токсин столбняка (например, эпитопы P2 и P30), поверхностный антиген гепатита В, токсин коклюша, F-белок вируса кори, основной белок внешней мембраны *Chlamydia trachomatis*, токсин дифтерии (например, CRM197), антигены *T Plasmodium falciparum circumsporozite*, *CS Plasmodium falciparum*, триозофосфат изомеразы *Schistosoma mansoni*, *TraT Escherichia coli* и гемагглютинин (ГА) вируса гриппа. Иммуногенные пептиды по настоящему изобретению также можно конъюгировать с Т-клеточными антигенными детерминантами, описанными в публикациях Sinigaglia F. et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer J. et al., *Cell*, 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); в патенте WO 98/23635; и авторами Southwood S. et al., *J. Immunology*; 160:3363-3373 (1998); и Giannini G. et al., *Nucleic Acids Res.* 12: 4063-4069 (1984), (все из которых включены со ссылкой в настоящее изобретение во всех целях). Дополнительные примеры включают:

Гемагглютинин вируса гриппа: HA<sub>307-319</sub>  
 CS малярии: антигенная детерминанта T3 EKKIAKMEKASSVFNV,  
 (SEQ ID NO: 67).  
 Поверхностный антиген гепатита В: HBsAg<sub>19-28</sub> FFLLTRILTI,  
 (SEQ ID NO: 68).  
 Белок теплового шока 65: hsp65<sub>153-171</sub> DQSIGDLIAEAMDKVNEG,  
 (SEQ ID NO: 69).  
 Вацилла Кальметта-Герена QVHFQPLPPAVVKL, (SEQ ID NO: 70).  
 Токсин столбняка: TT<sub>830-844</sub> QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO:  
 71).  
 Токсин столбняка: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSFWLRVPKVS ASHLE, (SEQ ID  
 NO: 72).  
 Вирус иммунодефицита человека HIV gp120 T1:  
 KQIINMWQEVGKAMYA, (SEQ ID NO: 73).  
 Токсин столбняка: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE  
 HIV gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA.

Альтернативно, можно создавать конъюгат путем связывания средств по изобретению по меньшей мере с одним Т-клеточным эпитопом искусственного происхождения, способным к связыванию с большой пропорцией молекул II класса главного комплекса гистосовместимости МНС, например с пан-DR-эпитопом ("PADRE"). Описание PADRE приведено в патенте США 5736141, WO 95/07707 и в публика-

ции Alexander J. et al., *Immunity*, 1:751-761 (1994) (каждая из которых включена в настоящее изобретение со ссылкой во всех целях). Предпочтительный пептид PADRE представляет собой AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 74) (общие остатки выделены жирным шрифтом), в котором X предпочтительно является циклогексилаланином, тирозином или фенилаланином, при этом наиболее предпочтительным является циклогексилаланин.

Иммуногенные средства могут быть связаны с носителями посредством химических связей. Методы связывания иммуногена с носителем включают образование дисульфидных связей с использованием N-сукцинимидил-3-(2-пиридил-тио)пропionato (SPDP) и сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) (если в пептиде не хватает сульфгидрильной группы, ее можно обеспечить путем добавления остатка цистеина). Указанные средства создают дисульфидную связь между собой и остатком пептида цистеина в одном белке и амидную связь посредством эпсилон-аминогруппы на лизине или посредством другой свободной аминогруппы в других аминокислотах. Многие из таких дисульфидно/амино-образующих средств описаны в журнале *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Другие бифункциональные связывающие средства образуют не дисульфидную связь, а тиоэфир. Многие из таких тиоэфир-образующих средств являются коммерчески доступными и включают реактивные сложные эфиры 6-малеимидокапроновой кислоты, 2-бромуксусной кислоты и 2-йодоуксусной кислоты, 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоновой кислоты. Карбоксильные группы можно активизировать путем сочетания их с сукцинимидом или 1-гидроксил-2-нитро-4-сульфоновой кислотой, натриевая соль.

Иммуногенность можно улучшить путем добавления спейсерных остатков (например, Gly-Gly) между T<sub>h</sub> (Т-хелперной) эпитопом и пептидным иммуногеном по изобретению. В дополнение к физическому отделению T<sub>h</sub>-эпитопа от В-клеточного эпитопа (т.е. иммуногенного пептида), глициновые остатки могут разрушать любые искусственные вторичные структуры, созданные посредством присоединения T<sub>h</sub>-эпитопа к иммуногенному пептиду, и, таким образом, устранять интерференцию между Т-клеточными и/или В-клеточными ответами. Таким образом, конформационное разделение эпитопа адьюванта и домена активации антитела позволяет достичь более эффективного взаимодействия между представленным иммуногеном и подходящими T<sub>h</sub>-клетками и В-клетками.

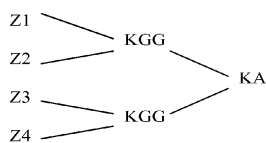
Для усиления индукции Т-клеточного иммунитета к средству по настоящему изобретению у большего процентного количества субъектов с разными типами HLA можно изготавливать смесь конъюгата с разными T<sub>h</sub>-клеточными эпитопами. Смесь может содержать смесь по меньшей мере двух конъюгатов с разными T<sub>h</sub>-клеточными антигенными детерминантами, смесь по меньшей мере трех конъюгатов с разными T<sub>h</sub>-клеточными эпитопами или смесь по меньшей мере четырех конъюгатов с разными T<sub>h</sub>-клеточными эпитопами. Смесь можно вводить с адьювантом.

Иммуногенные пептиды также могут представлять собой белки, слитые с носителями (т.е. гетерологичными пептидами). Иммуногенный пептид может быть связан с аминоконцом носителем, с карбокси-концом носителя или с двумя указанными концами. Необязательно, в слитом белке могут присутствовать множественные повторы иммуногенного пептида. Необязательно, иммуногенный пептид может быть связан с множественными копиями гетерологичного пептида, например, и на N-конце, и на С-конце пептида. Необязательно, множественные копии иммуногенного пептида могут быть связаны с множественными копиями гетерологичного пептида, которые связаны друг с другом. Некоторые пептиды носителя служат индуктором Т-клеточного ответа адьюванта на пептид-носитель. Активированные Т-клетки адьюванта, в свою очередь, вызывают В-клеточный ответ на иммуногенный пептид, связанный с носителем.

Ниже показаны некоторые примеры слитых белков, подходящих для использования в настоящем изобретении. Некоторые из этих слитых белков содержат сегменты AA, связанные с эпитопами токсоида столбняка, например, описанные в патентах США 5196512, EP 378881 и EP 427347. Некоторые слитые белки содержат сегменты AA, связанные по меньшей мере с одним пептидом PADRE, описанным в патенте США 5736142. Некоторые гетерологичные пептиды представляют собой разнородные Т-клеточные эпитопы, тогда как другие гетерологичные пептиды являются универсальными Т-клеточными эпитопами. В некоторых способах средство, предназначенное для введения, является просто единственным слитым белком с сегментом AA, который связан с гетерологичным сегментом в линейной конфигурации. Терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть представлены формулой. Например, в некоторых способах средство представляет собой мультимер слитых белков, представленный формулой 2<sup>x</sup>, в которой x является целым числом от 1 до 5. Предпочтительно x равен 1, 2 или 3, при этом наиболее предпочтительно x равен 2. Если x равен 2, такой мультимер имеет четыре слитых белка, связанных в предпочтительной конфигурации, называемой MAP4 (см. патент США 5229490).

Ниже показана конфигурация MAP4, в которой получают разветвленные структуры посредством начала пептидного синтеза в аминах лизина и на N-конце и в боковой цепи. В зависимости от количества повторов лизин вставляются в аминокислотную последовательность и допускают ветвление, при этом получаемая структура будет представлять собой множественные N-концы. В этом примере четыре идентичных N-конца были получены на разветвленном лизин-содержащем ядре. Такая мультиплетность в значительной степени повышает реактивность аутоиммунных В-клеток. В приведенных ниже примерах

Z относится к иммуногенному фрагменту AA, AL или фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> и Z1-4 относится к иммуногенному фрагменту (фрагментам) AA, AL или фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Фрагменты могут быть сходными друг с другом или разными.



Другие примеры слитых белков включают:

Z-токсоид столбняка 830-844 в конфигурации MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71)

Z-токсоид столбняка 947-967 в конфигурации MAP4:

Z-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 72)

Z-токсоид столбняка 830-844 в конфигурации MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71)

Z-токсоид столбняка 830-844 + 947-967 в линейной

конфигурации:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE, (SEQ ID NO: 75).

Пептиды PADRE (все в линейных конфигурациях), в которых X предпочтительно представляет собой циклогексилаланин, тирозин или фенилаланин, при этом наиболее предпочтительным Z является циклогексилаланин:

AKXVAAWTLKAAA-Z, (SEQ ID NO: 74).

Z×3 PADRE пептид:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA, (SEQ ID NO: 74).

Z - овалбумин 323-339 в линейной конфигурации:

Z-ISQAVHAANAENEAGR, (SEQ ID NO: 76).

Дополнительные примеры слитых белков включают:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z-Z, (SEQ ID NO: 74).

Z-AKXVAAWTLKAAA, (Z- (SEQ ID NO: 74).

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z, (SEQ ID NO: 77).

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z, (SEQ ID NO: 77).

Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (SEQ ID NO: 77).

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (Z-Z- (SEQ ID NO: 77)

Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE- (SEQ ID NO: 78)

Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE, (SEQ ID NO:

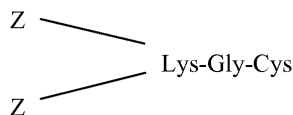
79).

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE-Z, (SEQ ID NO:

79).

QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE-Z, (SEQ ID NO: 79)

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID NO: 71) на двух разветвленных смолах: фрагменты могут быть одинаковыми или разными.



Можно использовать те же самые или подобные белки-носители и способы связи для получения иммуногенов, которые предполагается применять для создания антител против AA или иммуногенного фрагмента AA, AL или фрагмента X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Например, для получения моноклональных антител к AA или к иммуногенным фрагментам AA, AL или фрагменту X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub> лабораторному животному можно вводить AA или иммуногенные фрагменты AA, AL или фрагмент X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, связанные с носителем.

### VIII. Кодированные нуклеиновые кислоты как терапевтические средства

Терапевтические средства по настоящему изобретению также включают нуклеиновые кислоты. Иммуные реакции на амилоидные депо также можно индуцировать путем введения нуклеиновых кислот, кодирующих сегменты AA-пептида и их фрагменты, других иммуногенных пептидов, таких как фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, или антитела и цепи, составляющие эти антитела, такие как антитела 2A4, 8G9 и 7D8, применяемые для пассивной иммунизации. Такие средства для использования в способах по настоящему изобретению включают нуклеиновые кислоты, кодирующие AA-пептиды, которые при введе-

нии пациенту создают антитела, которые специфически связываются с одной или несколькими эпитопами между остатками 70-76 из AA, AL, или нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды, которые содержат фрагменты X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. Такие средства для использования в способах изобретения также включают нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, которые специфически связываются с С-концом неопитопа AA или с X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>. В частности, такие нуклеиновые кислоты кодируют антитела, которые специфически связываются с альфа-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHGAEDS (SEQ ID NO: 4), бета-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHDAEDS (SEQ ID NO: 5), гамма-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHDAEDS (SEQ ID NO: 5), альфа- и бета-изоформами HAA2 в пределах остатков 70-76 (GHGAEDS (SEQ ID NO: 4), HAA3 в пределах остатков 70-76 (GDHAEDS (SEQ ID NO: 7), HAA4 в пределах остатков 78-84 (STVIEDS (SEQ ID NO: 8), с мышинным AA1 (MAA1) в пределах остатков 69-75 (GRGHEDT (SEQ ID NO: 9), MAA2 в пределах остатков 69-75 (GRGHEDT (SEQ ID NO: 9), MAA3 в пределах остатков 62-68 (GHGAEDS (SEQ ID NO: 4) и MAA4 в пределах остатков 76-82 (NHGLETL

(SEQ ID NO: 11). Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК или РНК. Дополнительные предпочтительные нуклеиновые кислоты кодируют антитела, которые специфически связываются с HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) или TEDE (SEQ ID NO: 16) или с другими пептидами X<sub>1</sub>EDX<sub>2</sub>, упомянутыми выше. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно связан с регуляторными элементами, такими как промоторное и энхансерное средства, которые позволяют экспрессировать сегмент ДНК в предполагаемых клетках-мишенях пациента. Поскольку для индукции иммунного ответа желательна экспрессия в клетках крови, подходящими для прямой экспрессии являются промоторный и энхансерный участки из легких или тяжелых цепей генов иммуноглобулина или основной промежуточный ранний промотор и энхансер CMV. Связанные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируются в вектор. Для введения двухцепочечных антител эти две цепи можно клонировать в одни и те же или отдельные векторы. Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические средства изобретения, могут также кодировать по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. Раскрытия по настоящему изобретению, которые касаются применения адъювантов и применения носителей, *mutatis mutandis* применимы к их использованию с нуклеиновыми кислотами, кодирующими терапевтические средства по настоящему изобретению.

Доступны многие вирусные векторные системы, включающие ретровирусные системы (см., например, Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (см., например, Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); аденоассоциированные вирусные векторы (см., например, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), вирусные векторы семейства оспы, включая вирус вакцинии и вирусы птичьей оспы, вирусные векторы рода альфа-вирусов, такие как полученные из вирусов Sindbis and Semliki Forest (см., например, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (см. патент США 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (см. патент WO 96/34625) и папилломавирусы (One et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 и Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)). ДНК, кодирующая иммуноген, или вектор, содержащий указанную ДНК, можно упаковывать в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в патентах США 5208036, 5264618, 5279833 и 5283185. Векторы и ДНК, кодирующие иммуноген, могут также быть адсорбированными на макрочастицах-носителях или быть связанными с ними, примеры макрочастиц-носителей включают полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды и поли(лактид-ко-гликозиды), см., например, McGee et al., *J. Micro Encap.* (1996).

Векторы для генной терапии или голую ДНК может доставлять *in vivo* путем введения их отдельным пациентам, обычно путем системного введения (например, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, назальным, гастральным, внутривнутрикожным, внутримышечным, подкожным путем или внутривнутричерепной инфузией) или путем местного применения (см. например, патент США 5399346). Такие векторы могут дополнительно включать вспомогательные вещества, такие как бупивацин (патент США 5593970). Можно также вводить ДНК с применением генной пушки. (См. Xiao & Brandsma, выше). ДНК, кодирующая иммуноген, преципитирована на поверхности микроскопических металлических шариков. Выстреливание микроинъекций происходит с помощью ударной волны или расширения газа гелия, и они проникают через ткани на глубину в несколько клеточных слоев. Например, подходящим является устройство для доставки Accel™ Gene Delivery Device производства компании Agacetus, Inc Middleton WI. Альтернативно, проникновение через кожу голую ДНК в кровеносное русло можно осуществлять просто точечным нанесением ДНК на кожу с помощью химического или механического раздражения (см. патент WO 95/05853).

В дополнительных вариантах векторы, кодирующие иммуногены, можно доставлять в клетки *ex vivo*, например в клетки, эксплантационные у конкретного пациента (например, лимфоциты, аспирированные клетки костного мозга, биоптаты тканей), или в гематопозитические стволовые клетки универсального донора, с последующей реимплантацией пациенту, обычно после селекции клеток, в которые внедрили вектор.

### IX. Адьюванты

Иммуногенные вещества по настоящему изобретению, такие как пептиды, иногда вводят в комбинации с адьювантом. Адьювант повышает титр индуцированных антител и/или связывающую аффинность индуцированных антител по сравнению с показателями при использовании пептида единственным. Для активации иммунного ответа можно применять множество адьювантов в сочетании с иммуногенным фрагментом АА. Предпочтительные адьюванты увеличивают исходную реакцию на иммуноген и не вызывают конформационных изменений иммуногена, что влияет на качественную форму реакции. Предпочтительные адьюванты включают гидроокись алюминия и фосфат алюминия, 3-де-О-ацилированный монофосфофорил-липид (MPL™) (см. патент GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc, Гамильтон, Монтана, в настоящее время является часть Cogixa), RC-529 (Cogixa, Гамильтон, Монтана). Адьювант STIMULON™ QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделяемый из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, произрастающего в Южной Америке (см. Kensil et al., в издании *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, Массачусетс). Другие адьюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в сочетании с иммуностимуляторами, например монофосфорил-липидом (см. Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), полимеры плуроника и инактивированные микобактерии. Другим адьювантом является CpG (патент WO 98/40100). Адьюванты можно вводить в качестве компонента терапевтической композиции с активным средством или их можно вводить отдельно, перед введением терапевтического средства, одновременно или после его введения.

Предпочтительный класс адьювантов представляет собой соли алюминия (квасцы), например гидроокись алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия. Указанные адьюванты можно применять со специфичными иммуностимулирующими средствами, такими как монофосфорил-липид MPL или 3-де-О-ацилированный монофосфофорил-липид 3-DMP, QS-21, полимерные или мономерные аминокислоты, например полиглутаминовая кислота или полилизин, или без указанных средств. Другим классом адьювантов являются рецептуры эмульсии масло-в-воде. Такие адьюванты можно использовать с другими специфичными иммуностимулирующими средствами, такими как мурамиловые пептиды (например, N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидрофосфорилокси)этиламин (MTP-PE), N-ацетилглюкозоаминил-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглу-L-ала-дипальмитокси-пропиламид (DTP-DPP) THERAMIDE™) или другие компоненты оболочки бактериальной клетки, или без вышеперечисленных средств. Эмульсии масло-в-воде включают (a) MF59 (патент WO 90/14837), содержащую 5% сквалена, 0,5% Твин-80 и 0,5% Span-85 (которая необязательно содержит варьирующее количество MTP-PE), которую помещают в субмикронные частицы, используя микрофлюидизатор, например микрофлюидизатор модели HOY (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, содержащую 10% сквалена, 0,4% Твин-80, 5% плуроник блок-полимер L121 и thr-MDP, которые или микрофлюидизируют в субмикронную эмульсию, или интенсивно перемешивают для получения эмульсии с большим размером частиц, и (c) адьювантную систему RIBI™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Гамильтон, Монтана), содержащую 2% сквалена, 0,2% Твин-80, и один или больше компонентов оболочки бактериальной клетки из группы, состоящей из монофосфорил-липида А (MPL), димиколята трегалозы (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (DETOX™).

Другой класс предпочтительных адьювантов представляет собой сапониновые адьюванты, такие как STIMULON™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA), или образованные из них частицы, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы) и ISCOMATRIX. Другие адьюванты включают RC-529, GM-CSF, полный адьювант Фрейнда (CFA) и неполный адьювант Фрейнда (IFA). Другие адьюванты включают цитокины, такие как интерлейкины (например,  $\alpha$ - и  $\beta$ -пептиды IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 и IL-15), макрофаго-колониестимулирующий фактор M-CSF (MCSF), гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухолей (TNF), хемокины, такие как MIP1  $\alpha$ - и  $\beta$ - и RANTES. Другим классом адьювантов являются аналоги гликолипидов, включающие N-глицозидамины, N-глицозилмочевины и N-глицозилкарбаматы, в сахарном остатке каждого из которых имеется замена на аминокислоту, в качестве иммуномодуляторов или адьювантов (см. патент США № 4855283). Также в качестве адьювантов можно использовать белки теплового шока, например HSP70 и HSP90.

Адьювант можно вводить с иммуногеном в виде монолитной композиции или его можно вводить перед введением иммуногена, параллельно или после его введения. Иммуноген и адьювант можно упаковывать и поставлять в одном флаконе или их можно упаковывать в отдельных флаконах и смешивать перед применением. Иммуноген и адьювант обычно упаковывают с маркировкой, на которой указано предназначенное терапевтическое применение. Если иммуноген и адьювант упакованы отдельно, упаковка обычно включает инструкции по смешиванию перед применением. Выбор адьюванта и/или носителя зависит от устойчивости иммуногенных рецептур, содержащих адьювант, от пути введения, схемы введения, эффективности адьюванта для вакцинируемых видов, и в отношении людей фармацевтически

приемлемым адъювантом является адъювант, получивший одобрение подходящих регулирующих органов для введения человеку, или возможный для одобрения. Например, полный адъювант Фрейнда не подходит для введения человеку. Предпочтительными являются квасцы, MPL и QS-21. Необязательно, можно одновременно применять два или больше разных адъюванта. Предпочтительные комбинации включают квасцы с MPL, квасцы с QS-21, MPL с QS-21, MPL или RC-529 с GM-CSF и совместное введение квасцов, QS-21 и MPL. Также можно использовать неполный адъювант Фрейнда (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), необязательно в комбинации с каким-либо из квасцов, QS-21 и MPL и всех сочетаний из них.

#### Х. Пассивное введение антител

Терапевтические средства по настоящему изобретению включают антитела, которые специфически связываются с эпитопом, содержащим  $X_1EDX_2$  в агрегированном амилоидном белке, где  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P, A или любой другой аминокислотный остаток, непосредственно предшествующий ED в этом агрегированном амилоидном белке; и  $X_2$  представляет собой T, S, E, R, I, V, F, A или любой другой аминокислотный остаток, расположенный сразу после ED в этом агрегированном амилоидном белке, включающем эпитопы в амилоидных пептидах, таких как AA-пептиды. Антитела, применяемые для пассивного введения, могут быть антителами, которые связываются с эпитопами N-конца или C-конца AA. Другие амилоидные белки, в дополнение к сывороточному амилоидному белку A, включают сывороточный A-амилоидный белок, белок легкой цепи иммуноглобулина, такой как, например, V $\lambda$ 6 Wil или V $\kappa$ , человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR) и ApoA1, а также другие, перечисленные в табл. 1 выше.

Пептид AA образуется путем протеолитического расщепления SAA. Предпочтительные антитела специфически связываются с неоэпитопами AA, которые образуются при протеолитическом расщеплении SAA. Предпочтительные антитела специфически связываются с C-концом неоэпитопа из AA, в частности, такие антитела специфически связываются с альфа-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHGAEDS SEQ ID NO: 4), бета-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), гамма-изоформой HAA1 в пределах остатков 70-76 (GHDAEDS, SEQ ID NO: 5), альфа- и бета-изоформами HAA2 в пределах остатков 70-76 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10), HAA3 в пределах остатков 70-76 (GDHAEDS, SEQ ID NO: 7), HAA4 в пределах остатков 78-84 (STVIEDS, SEQ ID NO: 8), с мышинным AA1 (MAA1) в пределах остатков 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), MAA2 в пределах остатков 69-75 (GRGHEDT, SEQ ID NO: 9), MAA3 в пределах остатков 62-68 (GHGAEDS, SEQ ID NO: 10) и MAA4 в пределах остатков 76-82 (NHGLETL, SEQ ID NO: 11). Некоторые антитела связываются с эпитопом только в одном из указанных пептидов. Другие антитела связываются с эпитопами более чем в одном из указанных пептидов. Например, некоторые антитела специфически связываются с пептидом GHGAEDS (SEQ ID NO: 4) и пептидом GHDAEDS, (SEQ ID NO: 5). Некоторые антитела связываются с пептидом GHGAEDS (SEQ ID NO: 4) и при этом не образуют специфического связывания с пептидом GHDAEDS (SEQ ID NO: 5). Связывание по меньшей мере с одним из человеческих AA-пептидов является предпочтительным. Связывание по меньшей мере с одним из человеческих AA-пептидов и с соответствующим мышинным пептидом представляется полезным, поскольку одно и то же антитело можно тестировать на мышинной модели и впоследствии применять у людей. Некоторые предпочтительные антитела специфически связываются с антигенными детерминантами в следующих остатках: остатки альфа-изоформы HAA1 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74 или остатки MAA1 70-75, 71-75, 72-75, 73-75, 69-74, 69-73, 69-72, 69-71, 70-74, 71-74, 72-74, 70-73, 70-72. Такие антитела обычно специфически связываются с амилоидными депо, но могут связываться или не связываться с растворимым AA. Если считается, что антитело специфически связывается с эпитопом в пределах указанных остатков, например с остатками 70-76 альфа-изоформы HAA1, то подразумевается, что указанное антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим указанные остатки (т.е. остатки 70-76 из альфа-изоформы HAA1, в качестве примера). Такое антитело необязательно контактирует с каждым остатком в пределах остатков 70-76 альфа-изоформы HAA1, не придает каждой отдельной замене или делеции аминокислоты в остатках 70-76 альфа-изоформы HAA1 обязательно значительного влияния на связывающую аффинность. Такие неоэпитопные антитела связываются с AA, но не с SAA. Можно определять эпитопную специфичность антитела, например, согласно описанию в патенте WO 00/72880.

Антитела, используемые для пассивного введения, могут быть антителами к N-концевым эпитопам AA. Предпочтительные антитела специфически связываются с N-концевым неоэпитопом AA, в особенности такие антитела специфически связываются с остатками HAA1 1-15 (RSFFSFLGEAFD GAR, SEQ ID NO: 80), остатками HAA2 1-15 (RSFFSFLGEAFD GAR, SEQ ID NO: 80), остатками HAA3 1-15 (QGWLTLKAAGQGAK, SEQ ID NO: 81), остатками HAA4 1-15 (ESWRSFFKEA, (SEQ ID NO: 82), остатками MAA11-15 (GFFSFVHEAFQAGD, SEQ ID NO: 83), остатками MAA2 1-15 (GFFSFVHEAFQAGD, SEQ ID NO: 83), остатками MAA3 1-9 (EAGQGSRD, (SEQ ID NO: 84) и остатками 1-14 MAA4 (WYSFFREAVQGTWD, SEQ ID NO: 85). Некоторые антитела связываются только с эпитопом в пределах одного из этих пептидов. Другие антитела связываются с эпитопами более чем одного из этих пептидов. Например, некоторые антитела специфически связываются с пептидом



RSFFSFLGEAFD GAR (SEQ ID NO: 80) и пептидом QGWLTF LKAAGQGAK (SEQ ID NO: 81). Некоторые антитела связываются с пептидом RSFFSFLGEAFD GAR (SEQ ID NO: 80), при этом не связываются специфически с пептидом QGWLTF LKAAGQGAK (SEQ ID NO: 81). Связывание по меньшей мере с одним из человеческих AA-пептидов является предпочтительным. Связывание по меньшей мере с одним из человеческих AA-пептидов и с соответствующим мышинным пептидом является полезным, поскольку одно и то же антитело можно тестировать на мышинной модели и впоследствии применять у людей.

Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, состоящим из указанного  $X_1EDX_2$ . Предпочтительно такие антитела специфически связываются с указанным эпитопом в агрегированном амилоидном белке. Некоторые из таких антител предпочтительно специфически связываются с агрегированным амилоидным белком относительно мономерной формы такого амилоидного белка. В некоторых антителах  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P или A и  $X_2$  представляет собой T, S, E, D, R, I, V, F или A. В некоторых таких антителах, если  $X_1$  является H, то  $X_2$  представляет собой T или A; если  $X_1$  является A, то  $X_2$  является S, T, E или V; если  $X_1$  является T, то  $X_2$  представляет собой E; если  $X_1$  является F, то  $X_2$  является D; если  $X_1$  является S, то  $X_2$  является E, F или A; и если  $X_1$  является P, то  $X_2$  представляет собой E, I или F. В некоторых антителах  $X_1$  представляет собой H, T, F, S, P или A и  $X_2$  представляет собой T, S, E, D, R, I, V, F или A при условии, что если  $X_1$  представляет собой A, то  $X_2$  не является V. В некоторых антителах, если  $X_1$  является A, то  $X_2$  представляет собой S, T или E.

Некоторые антитела специфически связываются с эпитопом, содержащим аминокислотную последовательность GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), AEDV (SEQ ID NO: 23), SEDF (SEQ ID NO: 24) или SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15), TEDE (SEQ ID NO: 16), FEDD (SEQ ID NO: 17), SEDE (SEQ ID NO: 18), AEDE (SEQ ID NO: 19), PEDE (SEQ ID NO: 20), PEDI (SEQ ID NO: 21), PEDF (SEQ ID NO: 22), SEDF (SEQ ID NO: 24) и SEDA (SEQ ID NO: 25).

Некоторые антитела специфически связываются с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GHEDT (SEQ ID NO: 3), HEDT (SEQ ID NO: 12), AEDS (SEQ ID NO: 13), AEDT (SEQ ID NO: 14), HEDA (SEQ ID NO: 15) и TEDE (SEQ ID NO: 16).

Некоторые антитела индуцируют к пептиду, содержащему GHEDT (SEQ ID NO: 3), такие как, например, 2A4, 7D8 и 8G9 или их гуманизированные или химерные версии.

Антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Поликлональные сыворотки обычно содержат смесь популяций антител, которые специфически связываются с несколькими эпитопами по всей длине AA. Вместе с тем, поликлональные сыворотки могут быть специфичными для конкретного сегмента AA, такого как остатки 70-76 в альфа-изоформе HAA1.

Предпочтительные антитела являются химерными или гуманизированными (см. Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989) и патент WO 90/07861, патенты США № 5693762, 5693761, 5585089, 5530101 и патент Winter, США 5225539) или человеческими (Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); патенты США № 5877397, 5874299, 5814318, 5789650, 5770429, 5661016, 5633425, 5625126, 5569825, 5545806, публикации Nature, 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology, 14, 826 (1996), патент Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)). Альтернативный подход получения гуманизированного антитела, также известный как маскировка, описан в патенте США № 6797492. В качестве исходных материалов для изготовления гуманизированных антител доступны несколько мышинных антител с разными характеристиками связывания.

Типичными гуманизированными антителами являются гуманизированное антитело версии 7D8, гуманизированное антитело версии 7D29, гуманизированное антитело версии 7D19, гуманизированное антитело версии 7D47, гуманизированное антитело версии 7D39, гуманизированное антитело версии 7D66, гуманизированное антитело версии 8G9, гуманизированное антитело версии 8G3, гуманизированное антитело версии 8G4, гуманизированное антитело версии 8G51, гуманизированное антитело версии 8G22, гуманизированное антитело версии 8G30, гуманизированное антитело версии 8G46, гуманизированное антитело версии 2A4, гуманизированное антитело версии 2A20, гуманизированное антитело версии 2A44, гуманизированное антитело версии 2A77, гуманизированное антитело версии 2A13, и гуманизированное антитело версии 2A14. Гибридомы, которые продуцируют антитело 7D8 (JH80 7D8.29.19.47) и антитело 2A4 (JH80 2A4.20.44077) были депонированы соответственно 4 сентября 2008 г. и 17 декабря 2008 г. в Американской коллекции типовых культур (ATCC), расположенной в настоящее время по адресу: 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, согласно условиям будапештского соглашения о международном признании депонирования микроорганизмов для цели процедуры выдачи патентов (будапештское соглашение).

Человеческий изотип IgG1 является предпочтительным для антител к С-концевой области AA, поскольку обладает наиболее высокой из человеческих изотипов аффинностью для рецептора FcRI на фагоцитарных клетках. Некоторые антитела специфически связываются с AA со связывающей аффинно-

стью больше или равной примерно  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10}$  М<sup>-1</sup>.

Активную иммунизацию фрагментами АА можно комбинировать с пассивным введением антител. Примеры специфичных комбинаций включают фрагменты АА, содержащие

остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 71-76 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 72-76 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 73-76 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 74-76 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-75 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-74 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-73 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1 с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-72 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 71-75 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 72-75 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 73-75 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 73-75 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 71-74 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 71-73 альфа-изоформы НАА1;

фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 72-74 альфа-изоформы НАА1.

Дополнительно, фрагменты АА, содержащие остатки альфа-изоформы НАА1: 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74, можно объединять с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков альфа-изоформы НАА1: 71-76, 72-76, 73-76, 74-76, 70-75, 70-74, 70-73, 70-72, 71-75, 72-75, 73-75, 71-74, 71-73, 72-74. Фрагменты АА, содержащие остатки 70-76 альфа-изоформы НАА1, остатки 70-76 бета-изоформы НАА1, остатки 70-76 гамма-изоформы НАА1, остатки 70-76 альфа- и бета-изоформ НАА2, остатки 69-75 МАА1, остатки 69-75 МАА2 или остатки 62-68 МАА3, можно объединять с антителами, которые специфически связываются с эпитопом в пределах остатков 70-76 альфа-изоформы НАА1, остатков 70-76 бета-изоформы НАА1, остатков 70-76 гамма-изоформы НАА1, остатков 70-76 альфа- и бета-изоформ НАА2, остатков 69-75 МАА1, остатков 69-75 МАА2 или остатков 62-68 МАА3.

Некоторые из описанных выше антител не связываются специфически с мономерной формой или формой амилоидного белка-предшественника. Некоторые из таких антител специфически связываются с неозэпитопом, полученным при расщеплении белка-предшественника, в результате чего создается амилоидный белок.

Например, некоторые антитела специфически связываются с С-концевыми остатками мышинных АА-фибрилл, такими как HEDT (SEQ ID NO: 12), но специфически не связываются с пептидом, который продолжается в неамилоидной части SAA (GHEDTMADQE, SEQ ID NO: 61). Некоторые антитела специфически связываются с конформационным эпитопом. Некоторые из таких конформационных эпитопов являются линейными. Некоторые из таких конформационных эпитопов проявляются, если у амилоидного белка возникает агрегированная структура (например, фибриллярная) или он становится частично денатурированным. Примеры таких антител включают мышинные моноклональные антитела 2A4, 8G9 и 7D8, их человеческие, гуманизированные и химерные формы, другие антитела, которые специфически связываются с одним и тем же эпитопом, что и антитела 2A4, 8G9 или 7D8, и антигенсвязывающие фрагменты любых таких антител. Некоторые антитела специфически связываются с амилоидным белком, содержащим аминокислотные последовательности ED. Некоторые антитела специфически связываются с амилоидным белком, выбранным из группы, состоящей из белка легкой цепи иммуноглобулина, человеческого островкового амилоидного полипептида-предшественника (IAPP), бета-амилоидного

пептида, транстретина (TTR) и AроA1.

Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер из субъединиц. Каждый тетрамер составлен из двух идентичных пар полипептидных цепей, и каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает переменную область примерно из 100-110 или больше аминокислот, отвечающих, главным образом, за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет постоянную область, отвечающую главным образом за эффекторную функцию.

#### 1. Антитела.

В объем настоящего изобретения входят интактные антитела и антигенсвязывающие фрагменты антитела, также пегелированные антитела и фрагменты антител, а также антитела с нарушенной (например, уменьшенной или элиминированной) эффекторной функцией, например антитела, содержащие мутации или замещенные остатки в Fc области. Примеры иммунологически активных частей иммуноглобулиновых молекул включают фрагменты F(ab) и F(ab')<sub>2</sub> tri-Fab, Fab', Fv, scFv, di-Fab', которые можно создавать посредством ферментной обработки антитела, например пепсином, или создавать с помощью признанных в данной области технологий рекомбинантной инженерии. Дополнительные антигенсвязывающие фрагменты антител по изобретению включают фрагменты терапевтических антител, которые включают фрагменты пегелированных антител, такие как PEG-(пегелированные) Fab' и PEG-di-Fab'. Примеры мутантов с эффекторными функциями описаны в патенте США № 5624821, который включен полностью со ссылкой в настоящее изобретение. Некоторые антитела обладают уменьшенной связывающей аффинностью к RI-рецептору Fc-гамма. Мутантные антитела с эффекторной функцией включают антитела, содержащие мутации в шарнирной области. Некоторые мутантные антитела IgG содержат мутацию в постоянной области тяжелой цепи в одном или больше из положений 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322. В некоторых антителах имеются замены одного или нескольких из остатков 234, 236 и 237 на аланин. В некоторых антителах остаток 235 заменен на глутамин. В некоторых антителах остаток 297 заменен на аланин. В некоторых антителах остатки 318, 320 и 322 заменены на аланин. В некоторых антителах остаток 318 заменен на валин. В некоторых антителах остаток 322 заменен на глутамин. Антитела с усиленной эффекторной функцией включают антитела с единственной мутацией S239D и I332E и с двойной и тройной мутацией S239D/I332E и S239D/I332E/A330L (нумерация по Kabat).

#### 2. Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела можно изготавливать согласно описанию выше путем иммунизации подходящего субъекта иммуногеном. Титр антител у иммунизированного субъекта можно контролировать в течение времени с помощью стандартных способов, например твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием иммобилизованного антигена-мишени.

Если желательно, молекулы антитела, направленные против антигена-мишени, можно выделять от млекопитающего (например, из крови) и дополнительно очищать общеизвестными способами, такими как сефарозная хроматография А-белка, чтобы получить фракцию антитела, например IgG. В соответствующее после иммунизации время, например, когда титры анти-антигенного антитела являются наиболее высокими, от субъекта можно получать антитело-продуцирующие клетки и использовать их для изготовления моноклональных антител с помощью стандартных методик, таких как технология гибридом, описанная впервые авторами Kohler и Milstein (1975), *Nature*, 256:495-497) (см. также, Brown et al. (1981), *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980), *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:2927-31 и Yeh et al. (1982), *Int. J. Cancer* 29:269-75). Об изготовлении химерных поликлональных антител см. Buechler et al., патент США № 6420113.

#### 3. Моноклональные антитела.

Для получения моноклонального антитела можно применять любой из многих общеизвестных протоколов, используемых для слияния лимфоцитов и бессмертных клеточных линий (см., например, публикации G. Galfre et al. (1977), *Nature*, 266:55052; Geftter et al. *Somatic Cell Genet.*, цитированные выше; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, цитированная выше; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, цитированная выше). Кроме того, рядовой специалист в данной области сможет оценить, что существует ряд вариантов указанных способов, которые также могут быть полезными. Обычно бессмертную клеточную линию (например, клеточную линию миеломы) получают от тех видов млекопитающих, от которых получены лимфоциты. Например, мышинные гибридомы можно создавать путем слияния с бессмертной мышинной клеточной линией лимфоцитов мыши, иммунизированных иммуногеном препаратом по настоящему изобретению. Предпочтительными бессмертными клеточными линиями являются клеточные линии мышинной миеломы, которые чувствительны к культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"). В качестве пары для слияния можно использовать любую из множества миеломных клеточных линий согласно стандартным способам, например миеломные линии P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 или Sp2/0-Ag14. Указанные миеломные линии доступны в ATCC. Обычно HAT-чувствительные клетки мышинной миеломы сливают с мышинными спленоцитами с использованием полиэтиленгликоля ("PEG"). Затем проводят селекцию полученных в результате слияния клеток гибридомы с использованием среды HAT, которая уничтожает неслитые и недостаточно слитые миеломные клетки (неслитые спленоциты умирают через несколько дней, так как они не подверглись трансформа-

ции). Детекцию гибридных клеток, продуцирующих моноклональное антитело по изобретению, проводят путем скрининга супернатантов культуры гибридомы на антитела, которые связываются с антигеном-мишенью, например Аβ, с помощью стандартного анализа ELISA.

#### 4. Рекомбинантные антитела.

Альтернативой к изготовлению гибридом, секретирующих моноклональные антитела, можно идентифицировать и выделять моноклональное антитело путем скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки иммуноглобулинов (например, библиотеки фаговых дисплеев антител) с антигеном-мишенью, чтобы таким образом выделить элементы в библиотеке иммуноглобулинов, которые связываются с антигеном-мишенью. Комплекты для создания и скрининга библиотек фаговых дисплеев коммерчески доступны (например, Рекомбинантная фаговая система антител (Recombinant Phage Antibody System) Pharmacia, № каталога 27-9400-01; и комплект фаговых дисплеев Stratagene SurfZAP™, № каталога 240612). Дополнительно, примеры способов и реактивов, особенно подходящих для использования в создании и скрининге библиотеки дисплеев антител, можно найти в следующих публикациях: например, Ladner et al. U.S. Patent No. 5223409; Kang et al. PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower et al. PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter et al. PCT International Publication No. WO 92/20791; Markland et al. PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling et al. PCT International Publication No. WO 93/01288; McCafferty et al. PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner et al. PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991), *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992), *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85; Huse et al. (1989), *Science*, 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993), *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991), *Nature*, 352:624-628; Gram et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580; Garrard et al. (1991), *Bio/Technology*, 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991), *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982; and McCafferty et al. *Nature* (1990), 348:552-554.

#### 5. Химерные и гуманизированные антитела.

Дополнительно, в объем по настоящему изобретению входят рекомбинантные антитела, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, содержащие человеческие и нечеловеческие части, которые можно изготавливать с использованием стандартных способов рекомбинантных ДНК.

Термин "гуманизированный иммуноглобулин" или "гуманизированное антитело" относится к иммуноглобулину или антителу, которое включает по меньшей мере одну цепь гуманизированного иммуноглобулина или антитела (т.е. по меньшей мере одну гуманизированную легкую или тяжелую цепь). Термины "цепь гуманизированного иммуноглобулина" или "цепь гуманизированного антитела" (т.е. "легкая цепь гуманизированного иммуноглобулина" или "тяжелая цепь гуманизированного иммуноглобулина") относятся к цепи иммуноглобулина или антитела (т.е. соответственно к легкой или тяжелой цепи), имеющей вариабельную область, которая включает вариабельный каркасный участок в основном от человеческого иммуноглобулина или антитела, и участки, определяющие комплементарность (CDR), (например, по меньшей мере один CDR, предпочтительно два CDR, более предпочтительно три CDR) в основном от нечеловеческого иммуноглобулина или антитела, и дополнительно включает постоянные области (например, по меньшей мере одну постоянную область или ее часть в случае легкой цепи и три постоянные области в случае тяжелой цепи).

Термин "гуманизированная вариабельная область" (например, "гуманизированная вариабельная область легкой цепи" или "гуманизированная вариабельная область тяжелой цепи") относится к вариабельной области, которая включает вариабельный каркасный участок в основном от человеческого иммуноглобулина или антитела и участок, определяющий комплементарность (CDR), в основном от нечеловеческого иммуноглобулина или антитела.

Выражение "в основном от человеческого иммуноглобулина или антитела" или "в основном человеческий" означает, что при выравнивании с человеческим иммуноглобулином или с аминокислотной последовательностью антитела в целях сравнения идентичность указанных участков составляет по меньшей мере 80-90%, 90-95%, или 95-99% (т.е. идентичность локальных последовательностей) с аминокислотной последовательностью человеческого каркасного участка или постоянного участка, что позволяет, например, осуществлять консервативные замены, замены консенсусных последовательностей, замены зародышевых линий, обратные мутации и т.п. Вставка консервативных замен, замен консенсусных последовательностей, замен зародышевых линий, обратных мутаций и т.п. часто называют "оптимизацией" гуманизированного антитела или цепи. Выражение "в основном от нечеловеческого иммуноглобулина или антитела" или "в основном нечеловеческий" означает, что иммуноглобулин или аминокислотная последовательность антитела являются идентичными по меньшей мере на 80-95%, предпочтительно по меньшей мере на 90-95%, более предпочтительно на 96, 97, 98 или на 99% идентичными иммуноглобулину или аминокислотной последовательности антитела от организма нечеловеческого происхождения, например от млекопитающего нечеловеческого происхождения.

Соответственно, все участки или остатки гуманизированного иммуноглобулина или антитела или цепи гуманизированного иммуноглобулина или антитела, кроме CDR, в основном идентичны соответст-

вующим участкам или остаткам одной или больше нативных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Термин "соответствующий участок" или "соответствующий остаток" относится к участку или остатку во второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которая занимает одинаковое (т.е. эквивалентное) положение, что и участок или остаток в первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, при оптимальном выравнивании первой и второй последовательностей в целях сравнения.

Термин "по существу идентичны" означает что две полипептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием значений веса промежутков по умолчанию имеют по меньшей мере на 50-60% идентичные последовательности, предпочтительно по меньшей мере на 60-70% идентичные последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 70-80% идентичные последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 80-90% идентичные последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 80-90% идентичные последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90-95% идентичные последовательности, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичные последовательности, (например, идентичность последовательностей составляет 99% или выше). Термин "по существу идентичные" означает что две полипептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием значений веса промежутков по умолчанию имеют по меньшей мере на 80-90% идентичные последовательности, предпочтительно по меньшей мере на 90-95% идентичные последовательности и более предпочтительно по меньшей мере на 95% или более идентичные последовательности (например, идентичность последовательностей составляет 99% или выше). Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как контрольная последовательность, с которой сравнивают тестовые последовательности. Используя алгоритм сравнения последовательностей, тестовые и контрольные последовательности вводят в компьютер, в случае необходимости задают координаты субпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Затем по алгоритму сравнения последовательности вычисляют процент идентичности последовательностей для тестовой последовательности (последовательностей) относительно контрольной последовательности, на основе заданных параметров программы.

Можно проводить оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью поиска по методике сходства по Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), с помощью компьютерных программ выполнения указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из пакета программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison) или путем визуального наблюдения (см. в общем публикации Ausubel et al., выше). Одним из примеров алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и процента сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан авторами Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST является общедоступным в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (публично доступное на Интернет-сервере Национальных институтов здоровья NCBI)). Обычно можно использовать параметры программы по умолчанию для проведения сравнения последовательностей, вместе с тем можно также использовать задаваемые параметры. Программа BLASTP для аминокислотных последовательностей использует по умолчанию длину слова (W) 3, ожидание (E) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10915 (1989)).

Предпочтительно положения неидентичных остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами. В целях классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты разделены на группы следующим образом:

- группа I (гидрофобные боковые цепи): норлейцин, метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин;
- группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): цистеин, серин, треонин;
- группа III (кислые боковые цепи): аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;
- группа IV (основные боковые цепи): аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин;
- группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): глицин, пролин;
- группа VI (ароматические боковые цепи): триптофан, тирозин, фенилаланин.

Консервативные замены охватывают замены между аминокислотами одной группы. Неконсервативные замены представляют собой обмен члена одной из указанных групп на член из другой группы.

Предпочтительно гуманизированные иммуноглобулины или антитела связываются с антигеном с аффинностью, которая находится в диапазоне фактора трех, четырех или пяти от аффинности соответствующего негуманизированного антитела. Например, если негуманизированное антитело обладает связывающей аффинностью  $10^{-9}$  M, то гуманизированные антитела будут иметь связывающую аффинность по меньшей мере  $3 \times 10^{-8}$  M,  $4 \times 10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M или  $10^{-9}$  M. Описывая связывающие характеристики цепи иммуноглобулина или антитела, можно описать цепь на основании ее способности "направлять антигенное связывание" (например, A $\beta$ ). Считается, что цепь "направляет антигенное связывание", когда она

придает интактному иммуноглобулину или антителу (или его антигенсвязывающему фрагменту) свойства специфического связывания или связывающую аффинность. Считается, что мутация (например, обратная мутация) в значительной степени влияет на способность тяжелой или легкой цепи направлять связывание антигена, если она влияет (например, уменьшает), связывающую аффинность интактного иммуноглобулина или антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), которые содержат указанную цепь, по меньшей мере, в порядке величины, по сравнению с показателями аффинности антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), которые содержат эквивалентную цепь без указанной мутации. Мутация "по существу не влияет (например, уменьшает) на способность цепи направлять связывание антигена", если она влияет (например, уменьшает) на связывающую аффинность интактного иммуноглобулина или антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), которые содержат указанную цепь, только с фактором два, три, или четыре от показателей антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), которые содержат эквивалентную цепь без указанной мутации.

Термин "химерный иммуноглобулин" или антитело относится к иммуноглобулину или антителу, переменные области которого происходят от первых видов, и чьи постоянные области происходят от вторых видов. Можно конструировать химерные иммуноглобулины или антитела из генных сегментов иммуноглобулина, принадлежащих разным видам, например, с помощью технологий генной инженерии. В понятия "гуманизированный иммуноглобулин" или "гуманизированное антитело" не входят химерные иммуноглобулины или антитела, определение которых приведено ниже. По своей конструкции гуманизированные иммуноглобулины или антитела являются химерными (т.е. содержат области белков от более чем одного вида), но вместе с тем они включают дополнительные признаки (т.е. переменные области, содержащие донорские остатки CDR и акцепторные каркасные остатки), которые не обнаруживаются в химерных иммуноглобулинах или антителах, определенных согласно изобретению.

Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получать технологией рекомбинантных ДНК, известной в данной области техники, например используя способы, описанные в следующих публикациях: Robinson et al. International Application No. PCT/US86/02269; Akira, et al. European Patent Application 184, 187; Taniguchi, M., European Patent Application 171, 496; Morrison et al. European Patent Application 173, 494; Neuberger et al. PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Patent No. 4816567; Cabilly et al. European Patent Application 125023; Better et al. (1988), *Science*, 240:1041-1043; Liu et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3439-3443; Liu et al. (1987), *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:214-218; Nishimura et al. (1987), *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985), *Nature*, 314:446-449; and Shaw et al. (1988), *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S.L. (1985), *Science*, 229:1202-1207; Oi et al. (1986), *BioTechniques*, 4:214; Winter U.S. Patent 5225539; Jones et al. (1986), *Nature*, 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988), *Science*, 239:1534; and Beidler et al. (1988), *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Терапевтические средства также включают миметики антител, такие как миметики области, определяющей комплементарность (CDR).

#### 6. Человеческие антитела от трансгенных животных и фаговые дисплеи.

С другой стороны, в настоящее время возможно получение трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации способны продуцировать полную гамму человеческих антител при отсутствии эндогенной продукции иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена тяжелой цепи соединяющего участка ( $J_H$ ) антитела в химерной и зародышевой линиях мутантных мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антитела. Перенос матрицы гена зародышевой линии человеческого иммуноглобулина в такие зародышевые линии мутантных мышей приводит к продукции человеческих антител на антигенную провокацию. См., например, патенты США № 6150584; 6114598 и 5770429.

Полностью человеческие антитела также можно получать из библиотек фаговых дисплеев (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)). Химерные поликлональные антитела также могут быть получены из библиотек фаговых дисплеев (Buechler et al., патент США № 6420113).

#### 7. Биспецифичные антитела, слитые с антителом полипептиды и одноцепочечные антитела.

Биспецифичные антитела (BsAbs) являются антителами, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами. Такие антитела можно получать из полноразмерных антител или из фрагментов антител (например, биспецифичные антитела  $F(ab)_2$ ). Способы изготовления биспецифичных антител известны в данной области техники. Общепринятое получение полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар иммуноглобулиновых тяжелых цепей - легких цепей, при этом эти две цепи имеют разную специфичность (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). По причине рандомизированного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина указанные гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь разных молекул антитела (см. патент WO 93/08829 и публикацию Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)).

Биспецифичные антитела также включают шитые или "гетероконъюгированные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть соединено с авидином, другое с биотином или другим полезным элементом. Гетероконъюгированные антитела можно изготавливать с использованием

любых приемлемых способов сшивания. Подходящие сшивающие средства известны в данной области техники и раскрыты в патенте США № 4676980, наряду с некоторыми способами сшивания.

В еще одном аспекте антитело может быть химически или генетически слитым с полезным элементом, таким как реагирующая, обнаружимая или функциональная группа, например, с иммунотоксином, чтобы получить слитый с антителом полипептид. Такие полезные элементы включают, например, иммунотоксины, химиотерапевтические препараты и радиоизотопы, все из которых известны в данной области техники.

Одноцепочечные антитела также подходят для придания устойчивости согласно изобретению. Эти фрагменты содержат варибельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с варибельным доменом легкой цепи (VL) с помощью линкера, который позволяет каждой варибельной области соединяться друг с другом и восстанавливает антигенсвязывающий карман родительского антитела, из которого получены области VL и VH. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Подразумевается, что любая из упомянутых полипептидных молекул, единственная или в сочетании, подходит для изготовления в качестве стабилизированных рецептур согласно изобретению.

#### **XI. Субъекты, поддающиеся лечению**

В число субъектов или пациентов, поддающихся лечению, входят люди из группы риска заболевания, но не проявляющие симптомов, а также пациенты (больные) с выраженной текущей симптоматикой. Таким образом, способы по настоящему изобретению можно применять у всей популяции с профилактической целью, не нуждающейся в какой-либо оценке риска для субъекта - пациента. Способы по настоящему изобретению особенно полезны для людей с подтвержденным генетическим риском аутоиммунных патологий. В число таких людей входят люди, имеющие родственников с таким заболеванием, и люди из группы риска, который подтвержден анализом генетических или биохимических маркеров.

Пациенты, страдающие амилоидозом AA-типа, могут не иметь симптомов в течение длительного периода времени. Поэтому постановка клинического диагноза амилоидоза AA-типа часто опаздывает или упущена до момента, пока амилоидные депо не распространяются в организме. Считается, что диагностированы только 53% случаев у пациентов с явной симптоматикой. См. L. E. K. Consulting, *Independent Market Research* (2003).

Изобретение относится к способам, полезным для осуществления лечения или профилактики заболевания, характеризующегося депонированием амилоидного белка, например, такого, как вышеописанные заболевания, включающие перечисленные в табл. 1. Некоторые способы полезны для осуществления лечения или профилактики заболевания, характеризующегося депонированием амилоидного белка, содержащего аминокислотные последовательности ED. В некоторых способах, если амилоидный белок содержит аминокислотную последовательность AEDV, не вводят антитело для проведения лечения или профилактики болезни Альцгеймера или умеренного когнитивного нарушения. Амилоидный белок может представлять собой любой из амилоидных белков, описанных выше, включая белки, перечисленные в табл. 1, например, такие, как сывороточный A-амилоидный белок, белок легкой цепи иммуноглобулина, такой как, V $\lambda$ 6 W $\mu$ 1 или V $\kappa$ , человеческий островковый амилоидный полипептид-предшественник (IAPP), бета-амилоидный пептид, транстиретин (TTR) или A $\alpha$ 1.

Настоящие способы особенно полезны для людей, которые имеют достоверный риск амилоидоза AA-типа или амилоидоза AL-типа, имеют предполагаемый или подтвержденный диагноз амилоидоза AA-типа или амилоидоза AL-типа. В число таких людей входят без ограничения люди, имеющие хронические воспалительные заболевания, наследственные воспалительные заболевания и хронические микробные инфекции, такие как ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориазная артропатия, синдром Рейтера, болезнь Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, семейная средиземноморская лихорадка, лепра, туберкулез, бронхоэктатическая болезнь, язвы при пролежнях, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, миелома, макроглобулинемия, иммуноцитарная дискразия, моноклональная гаммапатия, оккультная дискразия. Хронические воспалительные и инфекционные состояния являются предпосылкой к развитию амилоидоза AA-типа и амилоидоза AL-типа, с проявлением в виде локального нодулярного амилоидоза, который может быть связан с хроническими воспалительными заболеваниями. В число людей с достоверным риском амилоидоза AA-типа также входят без ограничения люди, страдающие злокачественными новообразованиями, такими как ходжкинская лимфома, почечная карцинома, карциномы кишки, легкого и мочеполового тракта, базальноклеточная карцинома и волосатоклеточный лейкоз. Дополнительно, в число людей с достоверным риском амилоидоза AA-типа также входят без ограничения люди, страдающие лимфопролиферативными нарушениями, например болезнью Кастлемана.

Лечение больных без симптомов и с явной симптоматикой можно начинать в любое время перед диагностикой или после диагностики основного амилоидного заболевания AA-типа или AL-типа. Лечение обычно подразумевает множественное введение доз на протяжении времени. Лечение можно контролировать путем оценки реакций антител, активированных Т-клеток (побочный эффект) или В-клеток на терапевтическое средство (например, AA-пептид), или посредством скинтиграфии с радиометкой SAP в течение времени. При снижении реакции показано применение бустерной дозы.

## ХII. Схемы лечения

В общем схемы лечения охватывают введение средства, которое эффективно индуцирует иммунный ответ на амилоидный белок и предпочтительно на агрегированную форму указанного амилоидного белка, например АА- или AL-белка. Предпочтительно пациенту вводят иммуногенный фрагмент АА или AL или фрагмент  $X_1EDX_2$ . Для профилактических применений фармацевтические композиции или лекарства вводят пациенту, восприимчивому к возникновению амилоидоза, такому как амилоидоз АА-типа или амилоидоз AL-типа, или имеющему риск его возникновения, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения тяжести болезни или отдаления времени начала болезни, включающего физиологические, биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы болезни, ее осложнения и промежуточные патологические проявления в ходе развития болезни. Для терапевтических применений средство вводят пациенту с подозрением на наличие указанной болезни или уже страдающему такой болезнью по схеме, содержащей достаточное количество и частоту введения средства для излечения, или, по меньшей мере, частичного сдерживания, или торможения ухудшения симптомов болезни (физиологических, биохимических, гистологических и/или поведенческих), включающих их осложнения и промежуточные патологические проявления в ходе развития болезни. В некоторых способах введение средства приводит к уменьшению или устранению ранней симптоматики у пациентов с еще неразвившейся характерной патологией амилоидоза АА-типа или AL-типа. Количество, адекватное для осуществления терапевтического или профилактического лечения, называют терапевтически или профилактически эффективной дозой. Сочетание количества и частоты введения, адекватное для осуществления терапевтического или профилактического лечения, называют терапевтически- или профилактически эффективной схемой введения. В схемах как профилактических, так и терапевтических обычно осуществляют введение средств в нескольких дозах до достижения достаточной иммунной реакции. Дозу и частоту введения, адекватные для осуществления терапевтического или профилактического лечения, называют терапевтически- или профилактически эффективными схемами введения. Обычно проводят контроль иммунной реакции у пациента и вводят повторные дозы, если начинается уменьшение иммунной реакции. Иммунную реакцию можно контролировать с помощью обнаружения антител, например, к АА или AL в крови пациента или путем определения содержания, например, АА или AL.

Эффективные дозы средств и композиции по настоящему изобретению для лечения вышеописанных состояний варьируют в зависимости от ряда разных факторов, включающих способы введения, от локализации, предназначенной для введения, физиологического состояния пациента, вида пациента - человек или животное, от введения других лекарств и вида лечения - профилактическое или терапевтическое лечение. Обычно пациент является человеком, но лечению также могут подвергаться млекопитающие нечеловеческого происхождения, включающие трансгенных млекопитающих. Для оптимизации безопасности и эффективности необходимо титрование лечебных доз. Количество иммуногена зависит от сопутствующего введения адъюванта, если в отсутствие адъюванта необходимы более высокие дозы. Количество иммуногена для введения иногда варьирует от 1 до 500 мкг на одного пациента и чаще от 5 до 500 мкг на одну инъекцию для введения человеку. Иногда применяют более высокую дозу 1-2 мг на инъекцию. Обычно для каждой инъекции человеку применяют по меньшей мере 10, 20, 50 или 100 мкг. Количество иммуногена также зависит от количественного отношения иммуногенного эпитопа в иммуногене к количеству иммуногена в целом. Обычно на 1 мкг иммуногена используют от  $10^{-3}$  до  $10^{-5}$  мкмоль иммуногенного эпитопа. Выбор частоты введения может варьировать в значительной степени от одного раза в день до одного раза в год, до одного раза в десять лет. В любой конкретный день введения дозы иммуногена указанная доза при сопутствующем введении адъюванта составляет более 1 мкг/на пациента и обычно более 10 мкг/на пациента и более 10 мкг/на пациента и обычно более 100 мкг/на пациента в отсутствие адъюванта. Обычная схема введения состоит из иммунизации с последующими бустерными инъекциями с интервалами времени, например с интервалами в 6 недель. Другая схема введения состоит из иммунизации с последующими бустерными инъекциями через 1, 2 и 12 месяцев. Другая схема подразумевает инъекции каждые два месяца в течение жизни. Альтернативно, бустерные инъекции можно проводить нерегулярно, при показаниях на основе контроля иммунной реакции.

Дозы нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногены, варьируют в диапазоне от около 10 нг до 1 г, от 100 нг до 100 мг, от 1 мкг до 10 мг или от 30 до 300 мкг ДНК на одного пациента. Дозы для инфекционных вирусных векторов варьируют от 10 до 100 или больше вирионов на дозу.

Для пассивной иммунизации с антителом (при комбинированных способах лечения) диапазон дозы составляет от около 0,0001 до 100 мг/кг, от 0,5 до менее 5 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг массы тела пациента. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне от 1 до 10 мг/кг, или, другими словами, составлять 70г или 700 мг, или соответственно быть в диапазоне от 70 до 700 мг для пациента массой 70 кг. Как дополнительный пример, дозы могут составлять менее 5 мг/кг массы тела, или 1,5 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне от 0,5 до 1,5 мг/кг, предпочтительно по меньшей мере 1,5 мг/кг. Примерные схемы лечения подразумевают однократное введение каждые две недели, или введение один раз в месяц, или однократно введение каждые 3-6 месяцев. В некоторых способах два или больше моноклональных антитела с разной специфичностью связывания вводят одновременно, если доза каждого вводимого антитела находится в



пределах указанных диапазонов. Обычно антитело вводят способом многократного введения. Интервалы между введением моноклональных доз могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, и показание для введения определяют путем измерения уровня антитела к АА в крови пациента. В некоторых способах дозу подбирают до достижения концентрации антитела в плазме от 1 до 1000 мкг/мл и в некоторых способах от 25 до 300 мкг/мл. Альтернативно, антитело можно вводить в виде рецептуры с замедленным высвобождением, в этом случае необходимо менее частое введение. Дозы и частота введения варьируют в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. В целом, самым продолжительным периодом полувыведения обладают человеческие антитела, следом за ними располагаются гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела нечеловеческого происхождения. Дозы и частота введения могут варьировать в зависимости от профилактического или терапевтического предназначения лечения. Для применения с профилактической целью относительно низкую дозу вводят с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца жизни. Для применения с терапевтической целью иногда необходима относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами до уменьшения или прекращения прогресса заболевания и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не выявляют частичного или полного улучшения симптоматики заболевания. После этого пациента можно переводить на профилактический режим.

Вещества для индукции иммунного ответа с целью профилактического и/или терапевтического лечения можно вводить парентерально, местно, внутривенно, перорально, подкожно, внутриартериально, внутричерепным путем, внутрибрюшинно, интраназально или внутримышечно. Наиболее общепринятым путем введения иммуногенного средства является подкожный, хотя другие пути введения могут быть одинаково эффективными. Следующим самым распространенным путем введения является внутримышечная инъекция. Указанный тип инъекции чаще всего выполняют в мышцы руки или ноги. В некоторых способах средства вводят непосредственно в конкретную ткань с образовавшимся депо, например, путем внутричерепной инъекции. Предпочтительным путем введения антитела является внутримышечная инъекция или внутривенное вливание (в комбинированных способах лечения). В некоторых способах конкретные терапевтические антитела вводят непосредственно в череп. В некоторых способах антитела вводят в виде рецептуры с замедленным высвобождением или с помощью устройства, например устройства MEDIPAD™.

Вещества по изобретению часто вводят в виде фармацевтических композиций, содержащих активное терапевтическое средство, i.e., и ряд других фармацевтически приемлемых компонентов. См. издание Remington's Pharmaceutical Science (15<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Предпочтительная лекарственная форма зависит от предполагаемого пути введения и терапевтического применения. Композиции могут также включать, в зависимости от желательной рецептуры, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители или разбавители, которые представляют собой носители, обычно используемые для создания рецептуры фармацевтических композиций для введения животным или людям. Выбирают разбавитель, не влияющий на биологическую активность комбинированного препарата. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический фосфатно-буферный раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Дополнительно, фармацевтическая композиция или рецептура может также включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п.

Фармацевтические композиции могут также включать большие макромолекулы с замедленным метаболизмом, такие как белки, полисахариды, например хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (такие как латексная функционализированная Сефароза™, агароза, целлюлоза и т.п.), полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и липидные агрегаты (такие как капельки масла или липосомы). Дополнительно, указанные носители могут действовать как иммуностимулирующие средства (т.е. адъюванты).

Для парентерального введения средства по изобретению можно вводить в виде доз растворов или суспензий для инъекций указанного вещества в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода-масло, солевой раствор, глицерин или этанол. Дополнительно, в композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие средства, сурфактанты, регуляторы уровня pH, буферные вещества и т.п. Другими компонентами фармацевтических композиций являются масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло и вазелиновое масло. В общем предпочтительными жидкими носителями, в частности, в растворах для инъекций являются гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Антитела можно вводить в виде инъекции с замедленным всасыванием или имплантируемого препарата, рецептура которого может предусматривать длительное высвобождение активного компонента. В качестве примера композиция содержит моноклональное антитело в рецептуре 5 мг/мл в водном буфере, состоящем из 50 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, с уровнем pH 6,0, который регулируют HCl. Композиции для парентерального введения обычно являются, по существу, стерильными, изотоническими, и их

производят при соблюдении условий GMP (надлежащей медицинской практики) Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств FDA или подобных органов.

Обычно композиции изготавливают в форме для инъекций, как в виде жидких растворов, так и суспензий; также можно изготавливать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгированным или инкапсулированным в липосомах или микрочастицах, например из полилактида, полигликолида или сополимера, для усиления адьювантного эффекта, как рассмотрено выше (см. Langer, *Science* 249, 1527 (1990) and Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28, 97-119 (1997)). Вещества по настоящему изобретению можно вводить в форме инъекций замедленного всасывания или имплантируемого препарата, рецептура которых может позволять длительное или пульсирующее высвобождение активного компонента.

Дополнительные рецептуры, подходящие для других способов введения, включают пероральные, интраназальные и легочные рецептуры, суппозитории и трансдермальное применение.

Связующие вещества и носители для суппозиторий включают, например, полиалкиленгликоли или триглицериды; такие суппозитории можно изготавливать из смесей с содержанием активного компонента в диапазоне от 0,5 до 10%, предпочтительно 1-2%. Пероральные рецептуры включают наполнители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу и карбонат магния. Указанные композиции имеют форму растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, рецептур с постоянным высвобождением или порошков и содержат от 10 до 95% активного компонента, предпочтительно от 25 до 70%.

Местное применение может заключаться в трансдермальной или внутрикожной доставке. Местное применение можно облегчать с помощью совместного введения средства с холерным токсином или его детоксифицированными производными или субъединицами или с другими подобными бактериальными токсинами (см. Glenn et al., *Nature*, 391, 851 (1998)). Совместное введение может быть достигнуто при использовании компонентов в виде смеси или молекулярного связывания, полученного химическим сшиванием или экспрессией в виде слитого белка.

Альтернативно, можно осуществлять трансдермальную доставку, применяя кожный маршрут или используя трансферосомы ((Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1368, 201-15 (1998)).

### **XIII. Схемы лечения с комбинированной лекарственной терапией**

Комбинированную терапию согласно изобретению можно проводить как единственную, так и в сочетании с другим видом терапии, для лечения или профилактики амилоидоза AA-типа. Также комбинированная терапия согласно изобретению может проводиться в сочетании с другим видом терапии, с помощью которой осуществляют лечение или профилактику основной амилоидной болезни, например, воспалительных заболеваний, хронических микробных инфекций, злокачественных новообразований, наследственных воспалительных заболеваний и лимфопролиферативных патологий. Существует широкий диапазон доступных видов лечения по коммерческому использованию, по клинической оценке и в доклинических разработках, которые можно выбирать для использования с настоящим раскрытым изобретением для осуществления профилактики и лечения амилоидоза AA-типа с помощью комбинированной лекарственной терапии. Такие лекарственные средства могут представлять собой одно или несколько соединений, выбранных без ограничения из нескольких основных групп, а именно, (i) нестероидные противовоспалительные средства (НПВС; например, дитопрофен, диклофенак, дифлунизал, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, меклофенамат, мефенамовая кислота, мелоксикам, набумеон, натрия napроксен, оксапрозин, пироксикам, сулиндак, толметин, целекоксиб, рофекоксиб, аспирин, холиновый эфир салициловой кислоты, салсалат и натриевый и магниевый эфиры салициловой кислоты); (ii) стероиды (например, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон); (iii) БПРП, т.е. базовые противоревматические препараты, модифицирующие течение болезни (например, циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, лефлуномид, циклофосфамид, гидроксихлорокин, сульфазалазин, D-пеницилламин, миноциклин и препараты золота); или (iv) рекомбинантные белки (например, ENBREL® (этанесепт, растворимый рецептор TNF) и REMICADE® (инфликсимаб) химерное моноклональное анти-TNF антитело).

Продолжительность комбинированной терапии зависит от типа основного заболевания, которое лечат, от возраста и состояния пациента, стадии и типа болезни пациента и от реакции пациента на лечение. Врач может непосредственно наблюдать терапевтические эффекты и осуществлять любую необходимую регуляцию. Дополнительно, человек с более высоким риском развития амилоидоза AA-типа (например, человек с генетической предрасположенностью или наличием в анамнезе воспалительного заболевания или других основных заболеваний) или амилоидоза AL-типа может получать профилактическое лечение для замедления или отдаления во времени развития AL и AA агрегатов, таких как фибриллы.

Можно осуществлять независимый контроль дозировки, частоты и способа введения каждого компонента комбинированной терапии. Например, одно соединение можно вводить перорально три раза в день, тогда как второе соединение можно вводить внутримышечно один раз в день. Комбинированную

терапию можно проводить периодическими циклами, которые включают перерывы в лечении. Также соединения можно объединять в одной рецептуре таким образом, что при одном введении доставляются оба соединения. Комбинированный препарат по изобретению также может быть предоставлен в виде компонентов фармацевтической упаковки. Лекарства могут находиться в рецептуре совместно или раздельно и в индивидуальной по количеству дозировке. Каждое соединение смешивают с подходящим веществом носителя, и обычно оно присутствует в количестве от 1 до 95% веса от общего веса композиции.

Композиция может представлять собой лекарственную форму, которая подходит для перорального, парентерального (например, внутривенного, внутримышечного, подкожного), ректального, трансдермального, интраназального, влажлищного, ингаляционного или глазного введения. Таким образом, формой композиции могут быть, например, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, суспензии, эмульсии, растворы, гели, включающие гидрогели, пасты, мази, кремы, пластыри, примочки, устройства для доставки, суппозитории, клизмы, растворы для инъекций, импланты, спреи или аэрозоли. Фармацевтические композиции можно создавать согласно общепринятой фармацевтической практике (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19<sup>th</sup> ed.) ed. A.R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, N.Y.

#### **XIV. Способы контроля или диагностики амилоидоза AA-типа или AL-типа**

Способы контроля или диагностики амилоидоза AA-типа или AL-типа включают измерение концентраций в плазме SAA и С-реактивного белка, проведение биопсии тканей (почечной, ректальной, желудочной, гингивальной, жировой, ткани слюнных желез, лабиальных желез) и гистологического анализа с окрашиванием Конго красным и/или иммуноокрашиванием со специфичными антителами против агрегатов AA или AL, таких как фибриллы. Изобретение относится к способам обнаружения ответа антитела на пептид AA у пациента, страдающего амилоидозом AA-типа или восприимчивого к нему. Способы особенно полезны для контроля проводимого у пациента курса лечения. Указанные способы можно применять для контроля как терапевтического лечения пациентов с выраженной симптоматикой, так и профилактического лечения у бессимптомных пациентов. Некоторые способы подразумевают определение исходных показателей ответа антитела у пациента перед введением дозы иммуногенного средства, и сравнение их с показателями иммунного ответа после лечения. Значительное увеличение показателей ответа антитела (т.е. больше чем обычные границы экспериментальной ошибки в повторных измерениях одного и того же образца, выраженной в виде одного стандартного отклонения от средних значений таких измерений) сигнализирует о положительном результате лечения (а именно, что введение средства вызывает иммунный ответ или усиливает его). Если происходит незначительное изменение или уменьшение показателей ответа антитела, это указывает на отрицательный результат лечения. В общем, у пациентов, проходящих начальный курс лечения иммуногенным средством, предполагается увеличение ответа антитела при последовательном введении доз, который в конечном счете достигает плато. Обычно продолжают вводить средство при нарастании ответа антитела. Достижение плато является индикатором возможного прекращения или уменьшения дозы или частоты введения препарата.

В других способах контрольные значения (т.е. среднее значение и стандартное отклонение) ответа антитела определены для контрольной популяции. Обычно люди из контрольной популяции не получают предшествующего лечения. Затем проводят сравнение контрольного значения и измеренных показателей ответа антитела у пациента после введения терапевтического средства. Значительное увеличение относительно контрольного значения (например, более чем на одно стандартное отклонение от среднего значения) говорит о положительном результате лечения. Отсутствие значительного повышения или уменьшение показателей ответа антитела указывает на отрицательный результат лечения. Введение средства обычно продолжают при нарастании ответа относительно контрольных значений. Как указано выше, достижение плато относительно контрольных значений является индикатором возможного прекращения или уменьшения дозы или частоты введения препарата.

В других способах контрольные значения ответа антитела (например, среднее значение и стандартное отклонение) определяют в контрольной популяции людей, которые подвергались введению терапевтического средства и у которых реакция на лечение в виде ответа антитела достигла плато. Измеренные значения ответа антитела у пациента сравнивают с контрольными значениями. Если имеется незначительное отличие от контрольных показателей, измеренных у пациента (например, больше чем на одно стандартное отклонение), лечение может быть прекращено. Если показатели пациента значительно ниже контрольных значений, гарантировано длительное введение средства. Если показатели пациента остаются ниже контрольных значений, это может быть показанием для изменения режима лечения, например для применения другого адьюванта, фрагмента или для переключения на пассивное введение.

В других способах для определения необходимости возобновления лечения проводят контроль у пациента, не проходящего текущего лечения, который при этом прошел курс лечения раньше. Показатели ответа антитела, измеренные у пациента, можно сравнивать с показателями ответа антитела, которые пациент показывал после предыдущего курса лечения. Значительное уменьшение относительно предыдущих показателей (т.е. больше чем обычная граница погрешностей при повторных измерениях одного и

того же образца) служит показанием для возможного возобновления лечения. Альтернативно, измеренные у пациента показатели можно сравнивать с контрольными значениями (среднее значение плюс стандартное отклонение), которые определяют в популяции пациентов после прохождения курса лечения. Альтернативно, показатели, измеренные у пациентов, можно сравнивать с контрольными значениями в популяциях пациентов после профилактического лечения, у которых отсутствуют симптомы болезни, или в популяциях пациентов после терапевтического лечения, у которых выявлено улучшение патологических показателей. Во всех этих случаях значительное уменьшение относительно контрольного уровня (т.е. больше чем на одно стандартное отклонение) является показанием для возобновления лечения пациента.

В некоторых способах применяется скintiграфия с меченым йодом-123 или йодом-125 сывороточным Р-амилоидным компонентом ( $^{123}\text{I-SAP}$  или  $^{125}\text{I-SAP}$ ). Пациентам внутривенно вводят  $^{123}\text{I-SAP}$  или  $^{125}\text{I-SAP}$  и проводят визуализацию с помощью гамма-камеры. Радиоскintiграфия с SAP представляет собой полезный способ контроля развития амилоидоза у пациентов и оценки их лечения. Он специфичен для амилоида и может применяться для количественного контроля локализации и количества амилоидных депо у пациентов. У здоровых субъектов или у пациентов, не страдающих амилоидозом, не происходит накопление  $^{123}\text{I-SAP}$  и  $^{125}\text{I-SAP}$ . Радиоскintiграфию с SAP можно применять для контроля динамики метаболизма в амилоиде, и с ее помощью можно оценивать эффективность лечения, направленного на регресс амилоидных депо. Дополнительно, радиоскintiграфия с SAP является неинвазивным способом и позволяет полностью сканировать тело.

Способы изобретения подразумевают определение исходных показателей ответа антитела у пациента перед введением дозы средства и сравнение их с показателями иммунного ответа после лечения пациента. Значительное увеличение показателей ответа антитела (т.е. больше чем обычные границы экспериментальной ошибки в повторных измерениях одного и того же образца, выраженной в виде одного стандартного отклонения от средних значений таких измерений), сигнализирует о положительном результате лечения (а именно, что введение средства приводит к возникновению иммунного ответа или к его усилению). Если происходит незначительное изменение или уменьшение показателей ответа антитела, это указывает на отрицательный результат лечения. В общем у пациентов, проходящих начальный курс лечения иммуногенным средством, предполагается увеличение ответа антитела при последовательном введении доз, который в конечном счете достигает плато. Введение средства обычно продолжают при нарастании ответа антитела. Достижение плато является индикатором возможного прекращения или уменьшения дозы или частоты введения препарата.

Образцом ткани для анализа обычно является кровь, плазма, сыворотка, слизистая или спинномозговая жидкость от пациента. Образец анализируют для определения иммунного ответа на любую форму пептида AL или AA. Иммунный ответ можно определить по присутствию антител, которые специфически связываются с пептидом AL или AA. Антитела могут быть обнаружены в анализе связывания с лигандом, который специфически связывается с антителами. Обычно лиганд является иммобилизованным.

Связывание можно обнаруживать с использованием меченого антиидиотипического антитела.

В комбинированных схемах, использующих и активное и пассивное введение, можно применять аналогичные подходы для контроля уровня антитела, создаваемого пассивной иммунизацией.

Также можно применять способы диагностики амилоидоза, которые подразумевают, например, введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связан с обнаружимой меткой, при котором антитело или его фрагмент специфически связываются с эпитопом, включающим  $X_1\text{EDX}_2$  в агрегированном амилоидном белке, при этом  $X_1$  и  $X_2$  представляют собой любые аминокислоты, и обнаружение присутствия или отсутствия связанного антитела или его фрагмента. Обнаружение связанного антитела или фрагмента поддерживает диагноз амилоидоза. Полезные для диагностики амилоидоза антитела и фрагменты включают антитела, раскрытые в настоящем изобретении.

Диагностические антитела или фрагменты по настоящему изобретению можно вводить, например, путем внутривенной инъекции в тело пациента или непосредственно в мозг путем внутрочерепной инъекции. Дозу антитела легко определит специалист в данной области техники. Обычно антитело несет метку, хотя в некоторых способах присутствует немеченное антитело, и для связывания с этим антителом используют второе меченое средство. Выбор метки зависит от способов обнаружения. Например, для оптического обнаружения подходит флуоресцентная метка. Использование парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Можно применять радиометки, включающие  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  или  $^{90}\text{Y}$ . Такие метки можно обнаруживать с помощью позитронно-эмиссионной томографии PET или мультифункциональной томографической системы SPECT или других подходящих технологий.

Диагноз можно устанавливать также путем сравнения количества, размера и/или интенсивности меченых участков с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут отражать средние показатели в популяции не больных людей. Исходные значения также могут отражать предыдущие показатели, полученные у этого же пациента. Например, у пациента можно определять исходные значения и затем проводить сравнение измеренных значений с исходными значениями. Увеличение зна-

чений относительно исходных показателей подтверждает диагноз амилоидоза АА-типа.

Диагностические способы по изобретению можно применять для диагностики амилоидозного заболевания, включающего амилоидоз АА-типа, амилоидоз АL-типа, болезнь Альцгеймера, умеренное когнитивное нарушение, амилоидную полинейропатию, средиземноморскую лихорадку, синдром Макла-Уэллса, реактивный системный амилоидоз, связанный с системными воспалительными болезнями, амилоидоз, связанный с миеломой или макроглобулинемией, амилоидоз, связанный с иммуноцитарной дискразией, моноклональной гаммапатией, оккультной дискразией, или локальный нодулярный амилоидоз, связанный с хроническими воспалительными болезнями.

#### **XV. Животные модели амилоидоза АА-типа**

Амилоидоз АА-типа можно экспериментально вызывать у мышей с выраженным повышением концентрации SAA посредством инъекции нитрата серебра, казеина или липополисахарида. Указанные средства активируют выработку цитокинов. См. See Skinner et al. *Lab. Invest.* 36:420-427 (1997) and Kiselevsky et al. *Bailliere's Clin. Immunol. Immunopathol.* 8(3):613-626 (1994). В течение 2 или 3 недель после стимуляции воспаления у животных развиваются системные депо АА, сходные с депо, которые выявляют у больных с амилоидозом АА-типа. Эта латентная фаза значительно сокращается, если мышам вводят сопутствующую внутривенную инъекцию белка из экстракта мышинной селезенки или печени, несущей АА-амилоид. См. Axelrad et al. *Lab. Invest.* 47(2):139-46 (1982). Действие таких препаратов, ускоряющих амилоидогенное развитие, назвали "фактором усиления амилоидоза" (AEF). Авторы Lundmark et al. сообщают, что действующим началом AEF однозначно является сама АА-фибрилла. Дополнительно, они показали, что этот материал обладает чрезвычайно мощным действием, будучи активным в дозах менее 1 нг, и сохраняет свою биологическую активность на протяжении значительного периода времени. Примечательно, что AEF также эффективен при пероральном введении. Авторы пришли к заключению, что АА и возможно другие формы амилоидоза относятся к трансмиссивным болезням, сходным с прионсвязанными патологиями. См. Lundmark et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 6979-6984 (2002).

Амилоидов АА-типа также можно индуцировать у трансгенных линий мышей, несущих ген человеческого интерлейкина-6 при контроле с энхансером металлотионеин-I, в результате чего заметно возрастает концентрация SAA, и к 3-месячному возрасту развивается амилоидоз в селезенке, печени и почках. К моменту смерти в возрасте около 8-9 месяцев в органах таких трансгенных мышей обнаруживали обширные амилоидные депо. См. Solomon et al., *Am. J. Pathol.* 154(4):1267-1272 (1999).

Модель трансгенного быстро индуцируемого амилоидного заболевания (TRIAD) у трансгенных мышей является усовершенствованной вышеупомянутой трансгенной мышинной моделью. Мыши TRIAD несут ген человеческого интерлейкина-6 при контроле промотора гистосовместимости H-2L<sup>D</sup>. Введение AEF мышам TRIAD в возрасте 8 недель приводит к развитию выраженных АА-амилоидных депо в селезенке и печени в течение 3-4 недель. Впоследствии указанный процесс распространяется на другие органы и через 4-6 недель приводит к смерти. Развитие системного амилоидоза происходит быстрее по сравнению с описанной выше моделью трансгенных мышей. См. публикации University of Tennessee Research Corporation, WO 01/77167, Фармакопея, WO 95/35503 и Scripps, WO 95/30642 Wall et al. *Amyloid* 12(3): 149-156 (2005) (каждая из которых включена во всех целях по настоящему изобретению со ссылкой).

В биомедицинских исследованиях широко задействован мелкий примат Нового Света из Бразилии - обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*). Авторы Ludlage et al. сообщают, что у обыкновенной игрунки обнаруживали амилоидные депо в одном или больше органах, включающих печень, надпочечники, почки и кишечник. Авторы установили, что у этого примата развитие амилоидоза АА-типа может быть обусловлено наследственными факторами. В этой связи обыкновенная игрунка может служить уникальной экспериментальной моделью для исследования патогенеза и терапии АА-амилоидоза и других системных амилоидных заболеваний. См. Ludlage et al. *Vet. Pathol.* 42:117-124 (2005).

Порода собак шарпей несет аминокислотную последовательность АА с мотивом -AEDS и является особенно восприимчивой к АА-амилоидозу. Она представляет собой природную модель системного АА-амилоидоза, позволяющую оценивать новые диагностические и терапевтические применения АА амилоид-специфичных антител и других соединений.

#### **Примеры**

##### **Пример I.**

##### **Фрагменты АА.**

Пептиды, соответствующие аминокислотам 71-75 -GHEDT, как описано Yamamoto и Migita *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2915-2919, были синтезированы компанией AnaSpec, San Jose, Калифорния, США. Были индуцированы поликлональные антитела (Pab) АА и выделена фракция иммуноглобулина, как ранее описано авторами Bard, F. et al., (2000), *Nat. Med.* 6, 916-919.

##### **Пример II. Иммуноген для изготовления мышинных антител.**

Использовали эпитоп GHEDT, (SEQ ID NO: 3) с CG-линкером на N-конце. Пептид EPRB-39, содержащий указанный эпитоп, соединяли в паре с овечьим антимышиным антителом. Пептид EPRB-39 был получен в компании Anases, Сан-Хосе, Калифорния. Очевидно, что полученные антитела являются специфичными к неозпитопу, поскольку они не связываются специфически с пептидом, который охватывает области GHEDTIADQE (SEQ ID NO: 89).

Пример III. Методика иммунизации.

Мышам А/Ж в возрасте шести недель внутрибрюшинно вводили 50 мкг EPRB-39/овечьего антимышиного IgG с полным адъювантом Фрейнда (CFA), с последующим введением неполного адъюванта Фрейнда (IFA) один раз в две недели, проводя в общей сложности три инъекции. За три дня до слияния в хвостовую вену вводили 50 мкг EPRB-39 овечьего антимышиного (SAM) IgG в 90 мкл фосфатно-буферного раствора (ФБР). Титр, оцененный в анализе ELISA, составлял 1/10000 при высоком исходном уровне.

Номером слияния для EPRB-39 является JH80. Ниже приведен список клонов и клонов предельных разведений, которые являются активными:

7D8.29.19.47*, 39, 66	IgG2b k
8G9.3.4.51.22*, 30, 46	IgG2b k
2A4.20.44.77*, 13, 14	IgG2b k

7D47, 8G9 и 2A77 определены как предпочтительные субклоны. Очевидно, что полученные антитела являются специфичными к неозпитопу, поскольку они не реагируют с пептидом, который охватывает С-концевой сайт расщепления SAA.

Пример IV. Связывание антитела с агрегированным и растворимым АА.

Определение сывороточных титров (по серийным разведениям) и моноклональное связывание антитела с агрегированным АА выполняли посредством анализа ELISA, как ранее описано авторами Schenk D. et al., (1999), Nature, 400, 173-177. Растворимый АА относится к фибриллам АА, разрушенным ультразвуком в диметилсульфоксиде. Серийные разведения антитела инкубировали с  $^{125}\text{I}$ -АА с числом импульсов в минуту 50000 срт в течение ночи при комнатной температуре. 50 мкл жидкого раствора, содержащего 75 мг/мл белка А-сефарозу (Amersham Biosciences, Uppsala, Швеция)/200 мкг антимышиного кроличьего IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Пенсильвания, США), инкубировали с разведенными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, дважды промывали и производили подсчет в гамма-счетчике Wallac (PerkinElmer Life Science, Grove, Иллинойс, США). Все этапы выполняли в буфере для радиоиммунологического анализа, состоящего из 10 мМ Трис, 0,5 М NaCl, 1 мг/мл желатина и 0,5% Nonidet P-40, уровень pH 8,0.

Пример V. Анализ структуры V $\lambda$ 6 Wil.

Последовательности экспрессируемых генов зародышевой линии легких цепей человеческих V $\kappa$  и V $\lambda$  иммуноглобулина показаны на фиг. 21 и 22. За исключением подгрупп  $\kappa$ 1a,  $\lambda$ 1a,  $\lambda$ 3a и  $\lambda$ 3c, в них имеется остаток Glu-Asp, и указанная пара находится в положениях 81 и 82 во всех V $\kappa$  и V $\lambda$  генных последовательностях зародышевой линии (фиг. 21 и 22). Дополнительно, вторая зародышевая линия, кодируемая парой Glu-Asp в положениях 50 и 51, является уникальной для гена V $\lambda$ 6 зародышевой линии. Таким образом, V $\lambda$ 6 Wil содержит пары Glu-Asp и в 50-51, и в 81-82. Обе боковые цепи остатков 50 и 51 доступны на поверхности V $\lambda$ 6 Wil, по данным рентгенокристаллографии (фиг. 24). Напротив, только боковая цепь Glu81 выступает на поверхность, и боковая цепь Asp82 частично заглублена и, очевидно, взаимодействует (или посредством электростатических взаимодействий или H-связи) с боковыми цепями Lys79 и Arg61 (фиг. 25).

На основе этих исследований рентгеновской кристаллической структуры, учитывая относительную доступность боковых цепей Glu-Asp, авторы по настоящему изобретению пришли к заключению, что заглубленные Glu81 становятся доступными, поскольку домен принимает агрегированную (например, фибриллярную) структуру (или становится частично денатурированным), таким образом открывается криптоическая антигенная детерминанта, скрытая в других случаях.

Пример VI. Анализ связывания анти-АА моноклональных антител с V $\lambda$ 6.

A. Поверхностный плазмонный резонанс.

Для определения кинетики связывания нескольких моноклональных антител с фибриллами и мономером V $\lambda$ 6 Wil применяли поверхностный плазмонный резонанс. При концентрации 6,6 нМ все три антитела связывались с иммобилизованными синтетическими V $\lambda$ 6 Wil фибриллами с  $K_D$  около 1 нМ, и указанное значение сопоставимо со значением их реактивности с мышинными АА-фибриллами (фиг. 26). Отклонение (выраженное в единицах RU) во время фазы связывания было сходным со значением для mAb 7D8 и 2A4, но на 50% ниже, чем для 8G9. В этой связи предполагается, что плотность указанного антитела на фибриллах была ниже, чем у двух других средств, поскольку расчетные показатели аффинности были одинаковыми для всех трех антител. mAb IgG1 служило контролем и не проявляло связывания с фибриллами V $\lambda$ 6 Wil.

Титрование mAb 7D8 в диапазоне от 6,6 до 33,3 нМ вызывало ожидаемое уменьшение максимального отклонения, связанного с коп (фиг. 27). В общем кинетика связывания была сходной при каждой концентрации, хотя в этих пилотных экспериментах значение  $K_D$  для 7D8 при 26,6 нМ действительно отличались от значений, полученных при других концентрациях.

Для оценки специфичности реакции и гарантии, что связывание mAb с фибриллами происходит посредством классического взаимодействия F(ab)-антиген (в противоположность Fc-опосредованному свя-

зыванию или неспецифической адсорбции), данные о связывании были получены в присутствии иммуногенного пептида (p39) в концентрации 20 и 1 мкг/мл (фиг. 8). Пептид p41, который не связывается с mAb 7D8 при низких концентрациях, служил контролем. В присутствии 20 мкг/мл пептида p41 кинетика связывания mAb 7D8 с фибриллами Vл6 Wil была идентичной 7D8 единственному. Напротив, иммуногенный пептид p39 при 1 мкг/мл вызывал более чем 2-кратное уменьшение степени связывания, что оценивали по отклонению измеренного сигнала (фиг. 28). Ингибирование связывания с фибриллами 7D8 почти полностью подавлялось при использовании 20 мкг/мл пептида p39. Эти данные указывают, что mAb 7D8 связывается с фибриллами посредством F(ab) области молекулы, поскольку это взаимодействие может полностью подавляться иммуногенным пептидом.

С помощью биосенсора ВІАсоге исследовали реактивность mAb 7D8 с мономером Vл6, иммобилизованном на чипе. Антитело не реагировало с мономерным белком. Эти данные указывают, что антигенсвязывающий участок, распознаваемый mAb 7D8, присутствует на фибриллах, но не на растворимом белке-предшественнике, подразумевая, что антиген имеет конформационную или криптическую структуру.

#### В. Иммуногистохимия.

Иммуногистохимический анализ выполняли следующим образом: срезы толщиной 6 мкм, отрезанные от фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков, подвергали антигенной демаскировке путем инкубации с CitraPlus (BioGenex, San Ramon, Калифорния) в течение 30 мин при 90°C. Ткани подвергали иммуноокрашиванию раствором 3 мкг/мл mAb 2A4, 7D8 или 8G9. Контролем являлось IgG2a mAb TY11. Конъюгированное с HRPO лошадиное антимышиное Ig антитело (ImmPRESS Universal Reagent, Vector Labs, Burlingame, Калифорния) использовали в качестве вторичного реактива. Слайды обрабатывали 3,3'-диаминобензидином (Vector Labs) и исследовали с помощью микроскопа Leica DM500. Взаимодействие моноклональных антител с депо амилоидных тканей ALk и ALA также изучали с использованием иммуногистохимических исследований. Как показано на фиг. 29, амилоидные депо в щитовидной железе пациента, которые состояли из A2 фрагментов, подвергались иммуноокрашиванию с помощью 7D8, 2A4 и 8G9. Области реактивности коррелировали с амилоидными депо, обозначенными зелено-золотым двойным лучепреломлением, которое видно на срезе ткани, окрашенном Конго красным. Самая впечатляющая реактивность была достигнута с mAb 7D8 и mAb 2A4, тогда как 8G9, при положительных результатах, проявляло намного более слабую реакцию. Эти качественные показатели хорошо соотносятся с анализами ВІАсоге, в которых отмечено меньшее связывание 8G9 с фибриллами Vл6 Wil, чем показывали другие два реактива (фиг. 26). Изотип соответствовал mAb TY11, который служил контролем и не проявлял амилоидной иммунореактивности.

Аминокислотная последовательность этого белка A2 (SEQ ID NO: 86) (показанная ниже) содержит зародышевую линию, которую кодируют остатки Glu и Asp в положении 81 и 82 соответственно.

```

1      11      21      31d     35
GSVVTQPPS VSGAPRQVA ISCSSESENI GNNAVN WYQLPGKAP
45      55      65      73      83
KVLIIYIDLL PAVSRRFSG SRSSTAS LAIRGLQSD EGDYCAAND
93
DSLSAL

```

Изучение депо AL-к-амилоидной ткани показало положительную реактивность 2A4 и в меньшей степени 7D8 и 8G9. Было вновь выявлено соответствие между иммуноокрашиванием и двойным лучепреломлением, амилоидные участки окрашивались Конго красным. Реактивность mAb TY11 отсутствовала.

#### С. Радиовизуализация амилоидомы AL-типа с использованием 7D8, меченого <sup>125</sup>I.

Экспериментальная модель амилоидомы AL-типа *in vivo* использовали для изучения возможности визуализации человеческого AL-амилоида с радиометкой mAb 7D8. Эффективность радиомеченого 7D8, определяемая электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия SDS-PAGE, показала, что указанная метка <sup>125</sup>I включена в обе цепи, IgH и IgL, и достоверно не выявлено полос, связанных с фрагментацией или агрегацией. Визуализация с помощью СРЕКТ/СТ мышей, несущих индуцированную AL-амилоидому, показала, что меченое <sup>125</sup>I антитело локализовано в индуцированной, расположенной в области спины амилоидной массе, о чем свидетельствует накопление радиомеченых антител в амилоиде, по сравнению с тканями без амилоидного поражения (например, печень, сердце, селезенка и почки). Постороннее mAb IgG с радиометкой не накапливалось в амилоидной массе; вместе с тем, обнаружен свободный радиоактивный йодид, который накапливался в щитовидной железе, что говорит о катаболизме и дегалогенировании IgG антитела. Распределение меченого mAb <sup>125</sup>I-7D8 у мышей, несущих амилоидому, определяли количественно, путем измерения активности, связанной с амилоидной массой, по сравнению с показателями из печени, селезенки, почки, желудка, сердца и легкого. Эти данные подтверждали анализом с визуализацией СРЕКТ/СТ. Через 72 ч после инъекции (в этот момент времени производили забор ткани и получали изображения) амилоида содержала около 8% ID, что примерно в 4 раза превышает уровень, отмеченный в печени (в которой локализуется катаболизм

mAb) и в сердце, где предполагается высокая остаточная активность кровяного пула. Активность, определяемая в легком, была обусловлена способом эвтанази (данные не показаны).

Для подтверждения данных биораспределения производили забор тканей амилоидомы, а также печени, селезенки, сердца и почек, и срезы тканей были подготовлены к автордиографическому анализу. Радиоактивное мечение проводили следующим образом: антитело 7D8 метили  $^{125}\text{I}$  в дозе mCi, не содержащем редуктант (Perkin Elmer), с использованием ограничивающего количества хлорамина T, и суспендировали в ФБР, содержащем 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА/ФБР). Несвязанный изотоп и белковые агрегаты удаляли с помощью эксклюзионной жидкостной хроматографии на колонке Ultrogel AcA34 (Amersham Pharmacia). Для экспериментов визуализации собирали фракции, содержащие мономер IgG. Радиохимический выход составлял около 50%, обеспечивая специфичную активность около 25  $\mu\text{Ci}/\text{мкг}$ . Меченое  $^{125}\text{I}$  mAb подвергали SDS-PAGE (10% гели) в присутствии или в отсутствие редуцирующего средства и анализировали с помощью устройства Циклон для фосфор-визуализации. Согласно изображениям SPECT и измерениям биораспределения автордиограммы подтвердили значительное накопление  $^{125}\text{I}$ -7D8 в амилоиде по сравнению с печенью. Не было выявлено какого-либо захвата радиомеченого антитела  $^{125}\text{I}$ -7D8 в любых других органах (кроме ожидаемой активности в печени, связанной с катаболизмом антитела). Хотя mAb 7D8 имело относительно равномерное распределение в общей амилоидной массе, наблюдалась слегка более высокая плотность в периферических зонах на границе амилоид-живот. Отсутствовал захват радиомеченого контрольного IgG в каких-либо органах.

#### D. Выводы и заключение.

С помощью поверхностного плазмонного резонанса, иммуногистохимии и радиовизуализации *in vivo* установлено, что AA-реактивные антитела 2A4, 7D8 и 8G9 связываются с амилоидом AL-типа и фибриллами ( $K_d$  около 1 нМ), происходящими из легкой цепи иммуноглобулина. Вероятно, указанное взаимодействие происходит в глубококонсервативных Glu-Asp аминокислотах в положениях 81 и 82 соответственно, образующих криптический линейный эпитоп, который становится выступающим только при вставке амилоидогенной легкой цепи в фибриллы.

Пример VII. Анализ ELISA, демонстрирующий связывание антитела с пептидами  $X_1EDX_2$ .

Анализ ВIAsoge проводили для оценки связывания антител 2A4, 7D8 и 8G4 на пептидах разных последовательностей. Как показано в табл. 4, было выявлено, что антитела реагировали с пептидами, имеющими аминокислотную последовательность  $X_1EDX_2$ . Интересно, что антитела не реагировали с пептидами, имеющими дополнительные С-концевые остатки. Потому предполагается, что антитела специфически связываются с неэпитопом, образованным расщеплением SAA, чтобы создать свободный С-конец. Однако, как показано в примере V, свободный конец не является необходимым для связывания этих антител с V $\lambda$ 6 Wil, а скорее происходит конформация доменов  $X_1EDX_2$  с их адаптацией для связи с антителами, когда они принимают агрегированную (например, фибриллярную) структуру (или становятся частично денатурированными), таким образом открывается криптическая антигенная детерминанта, скрытая в других случаях.



Таблица 4

Пептид антитела	Положительный/отрицательный (пол/отр)	
2A4(39) CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	ПОЛ	
40 CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	ПОЛ	
41 GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	ОТР	
64 CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	ПОЛ	
65 CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	WEAK	
66 CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	ОТР	
67 CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	ПОЛ	
68 CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	ОТР	
69 CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	ОТР	
70 CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	ОТР	
71 CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	Ложно положительный ?	
7d8 (39) CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	ПОЛ	
40 CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	ПОЛ	
41 GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	ОТР	
64 CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	ПОЛ	
65 CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	ОТР	
66 CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	ОТР	
67 CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	ПОЛ	
68 CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	ОТР	
69 CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	ОТР	
70 CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	ОТР	
71 CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	ОТР	
8g4 (39) CGGHEDT, (SEQ ID NO: 87)	ПОЛ	
40 CGGAEDS, (SEQ ID NO: 88)	ПОЛ	
41 GHEDTIADQE, (SEQ ID NO: 89)	ОТР	
64 CGGAEDT, (SEQ ID NO: 90)	ПОЛ	
65 CGGHADT, (SEQ ID NO: 91)	ОТР	
66 CGGHEAT, (SEQ ID NO: 92)	ОТР	
67 CGGHEDA, (SEQ ID NO: 93)	Слабый	
68 CGGHEDTM, (SEQ ID NO: 94)	Ложно положительный ?	
69 CGGHEDTMA, (SEQ ID NO: 95)	Ложно положительный ?	
70 CGGHEDTMAD, (SEQ ID NO: 96)	ОТР	
71 CGGHED, (SEQ ID NO: 97)	ОТР	

#### Пример VIII. Иммуногистохимический анализ мышиноного АА.

В иммуногистохимическом анализе подтверждали реактивность супернатантов от гибридом, экспрессирующих антитела 2A4, 8G9 и 7D8, к мышинным АА-амилоидным депо в селезенке и печени (основные локализации накопления амилоида). Для этих исследований срезы тканей от мышей TRIAD с обширным амилоидом АА-типа в печени и селезенке (о чем свидетельствует зеленое двойное лучепреломление в депо, окрашиваемых Конго красным) окрашивали содержащими mAb супернатантами. Все три антитела связывались с амилоидом печени и селезенки. Напротив, отсутствовала какая-либо реактивность с культурой супернатантов, полученных из посторонних гибридом. Используя 2A4, 8G9 и 7D8, тестировали возможность иммуноокрашивания амилоида в свежих (нефиксированной), залитых в соединение OCT (с оптимальной температурой резания) срезах мышинной печени и селезенки. Доказано, что антитела mAb сохраняют свою способность связывать АА амилоид в синусах печени. Дополнительно, облегчалась интерпретация реактивности антитела в ткани селезенки, и перифолликулярный амилоид подвергался интенсивному иммуноокрашиванию. Чтобы показать специфичность связывания mAb с АА амилоидом, супернатанты mAb в разведении 1:25 предварительно инкубировали с 50 мкг/мл или пептида #39 (p#39) или #41 (p#41) в течение 1 ч при комнатной температуре. На фиксированной формалином ткани в качестве субстрата пептид p#39 (50 мкг/мл) значительно подавлял амилоидную реактивность

обоих mAb, 2A4 и 7D8 (результаты 8G9 находятся на рассмотрении). Напротив, пептид р#41 не показал эффективности. Сопоставимые результаты были получены на свежих тканях.

Пример IX. Иммуногистохимический анализ человеческого АА.

Сравнение аминокислотной последовательности мышиноного и человеческого SAA из положений 73-76 показало два идентичных остатка, консервативную замену Ser на Thr и неконсервативную замену Ala на His. Для тестирования возможности перекрестной реакции mAb 2A4, 8G9 и 7D8 с человеческими АА-амилоидными депо авторы проверили их реактивность к несущим АА-амилоид человеческим почке, надпочечнику, яичнику и печени. Во всех случаях супернатанты mAb проявляли иммуноокрашивание амилоидных депо. В ткани яичников пептид р#39 эффективно блокировал связывание антител mAb с периваскулярным АА-амилоидом, тогда как пептид р#41 не подавлял эту реакцию.

Пример X. Взаимодействие анти-АА из культуры супернатантов с АА-фибриллами мышиноного происхождения.

Взаимодействие mAb 2A4, 8G9 и 7D8 с АА-амилоидом вначале тестировали в анализе ELISA и данные, представленные в фиг. 31, анализировали с использованием программы SigmaPlot (SPSS Inc). Каждая точка отражает среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка SE (n=3). Супернатантную культуру посторонней гибридомы использовали в качестве контроля (Ctrl Culture Sup). Выявили чрезвычайно низкое отношение шум-сигнал, и результаты показали, что содержание mAb в первом сборе культуры был больше по сравнению со вторым сбором, о чем свидетельствует более сильный сигнал поглощения относительно супернатантного контроля. (Дополнительно, иммуногистохимическая реактивность в материале от 1 дня была выше, чем в образце от 2 дня). При более высоких значениях SE из этих данных очевидно, что связывающая аффинность 2A4, 8G9 и 7D8 была почти эквивалентной, при отсутствии реактивности в разведениях примерно после 1:64. По показателям связывания также предполагается, что емкость, т.е. количество связей mAb, варьирует при соотношении 7D8>8G9>2A4; вместе с тем приведенные данные не корректировались по концентрации mAb, и такая тенденция в последующих исследованиях не наблюдалась. По причине низкого сигнала и высокой вариабельности, выявленной в культуре супернатантов, и для более точного определения относительной связывающей аффинности антител mAb для мышинных и человеческих АА-амилоидных фибрилл (а также для получения материала с целью изучения биораспределения *in vivo*) было необходимо выделить mAb с помощью А-белковой аффинной хроматографии. Чистоту выделенных mAb устанавливали в SDS-PAGE, используя 10% акриламидные гели при редуцирующих и нередуцирующих условиях (фиг. 32). Образцы из полос 1-4 обрабатывали меркаптоэтанолом, полосы 5-9 были без обработки. Гель окрашивали красителем Кумасси синим: mAb 8G9, полосы 1 и 6; mAb 2A4, полосы 2 и 7; mAb 7D8, полосы 3 и 8; SP2/0 супернатантный контроль, полосы 4 и 9; пусто, полоса 5. Маркерами белка Mr (Std) являлись, сверху вниз: 176, 119, 75, 49, 39, 25 и 19 кДа. Взаимодействие очищенных mAb с иммунизирующим пептидом р#39, контрольным пептидом (р#41), мышинными и человеческими экстрактами АА было определено в анализе ELISA, как описано выше. Полученные данные анализировали путем подбора сигмоидальной кривой, используя программное обеспечение SigmaPlot и показатели концентрации mAb в растворе 50% насыщенности (EC<sub>50</sub>) (табл. 5).

Таблица 5

Значения EC<sub>50</sub> для связывания очищенного mAb

mAb	Субстрат			
	Человеческий АА	Мышиный АА (АЕФ)	Пептид 39	Пептид 41
8G9	31,7 нМ	5,64 нМ	4,0 нМ	>>100 нМ
2A4	26,4 нМ	4,09 нМ	3,4 нМ	>>100 нМ
7D8	13,3 нМ	1,84 нМ	2,3 нМ	>>100 нМ

Взаимодействие 3 mAb с пептидом р#39 показало насыщаемое связывание при значениях EC<sub>50</sub> в низком наномолярном диапазоне (см. выше табл. 5). Напротив, даже при самой высокой используемой концентрации mAb (100 нМ) обнаруживали небольшое связывание с пептидом р#41 (фиг. 33 - каждая точка показывает среднее значение  $\pm$  SE, (n=3 для каждой концентрации)). Эти данные подтверждают иммуногистохимические результаты, описанные выше, т.е. что пептид р#39 способен полностью блокировать связывание mAb с тканями, несущими АА-амилоид. Расчетные значения EC<sub>50</sub> для связывания каждого mAb с пептидом р#39 были в высокой степени идентичны, поскольку в одном случае экстракт мышиноного АА-амилоида использовали в качестве субстрата (фиг. 34 - каждая точка показывает среднее значение  $\pm$  SE (n=3 для каждой концентрации)). Расчетные значения EC<sub>50</sub> для mAb, связывающегося с экстрактом мышиноного АА, были чрезвычайно идентичны значениям, полученным при использовании в качестве субстрата пептида р#39 (фиг. 34; табл. 5). Напротив, если экстракт человеческого АА-амилоида высушивали на лунках микропланшета, значения EC<sub>50</sub> были ниже от 5 до 7 раз, чем значения, выявленные для мышиноного АА и пептида р#39 (фиг. 35 - каждая точка показывает среднее значение  $\pm$  SE (n=3 для каждой концентрации); табл. 5). Значение EC<sub>50</sub> для связывания mAb 7D8 было самым низким из указанных 3 тестируемых антител, и авторы по настоящему изобретению выбрали указанный реактив для совместной локализации *in vivo* и анализах визуализации. На значения EC<sub>50</sub> влияли две аминокислотные

замены в человеческой последовательности SAA относительно мышинового белка. Не будучи связанными с конкретной теорией, авторы изобретения объясняют более высокие значения EC50 для человеческого AA более плохой "пригодностью" боковых цепей аминокислоты в антигенсвязывающем сайте, вместе с тем, этот эффект соответствует только 5-кратному уменьшению относительной аффинности при поверхностной адсорбции амилоидных экстрактов, как в анализе ELISA. Кроме того, приведенные данные подтверждают наблюдение, что все 3 mAb связываются как с мышиной, так и с человеческой тканью AA-амилоидных депо.

Пример XI. Конкурентное связывание антител mAb с мышинным и человеческим AA-амилоидом.

Чтобы определить эффект, при его наличии, потенциальной денатурации при поверхностной адсорбции на микротитровальной лунке, оценивали реактивность 2A4, 8G9 и 7D4, используя конкурентный анализ ELISA, в котором использовали экстракт мышинового или человеческого AA-амилоида в качестве растворимого конкурента для взаимодействия с антителами mAb с поверхностным экстрактом AA.

Во всех случаях растворимые (неадсорбированные) амилоидные фибриллы AA и человеческого и мышинового происхождения были способны к конкуренции за 3 mAb, указывая на то, что антигенная детерминанта, распознаваемая реактивами, не зависит от частичной денатурации, которая происходит в результате поверхностной адсорбции. В общем экстракт мышинового AA (AEF) являлся лучшим конкурентом, чем человеческий AA (табл. 6).

Таблица 6

Значения IC <sub>50</sub> (мкг/мл) для связывания mAb с AA-амилоидом		
mAb	Человеческий AA <sup>1</sup>	Мышиный AA (AEF) <sup>2</sup>
8G9	>119,5	17,3
2A4	>211,7	14,7
7D8	>881,1	26,8

<sup>1</sup> Человеческий AA-амилоид в растворе, конкурирующий с адсорбированным мышинным AA (AEF).

<sup>2</sup> Мышиный AA (AEF) в растворе, конкурирующий с адсорбированным человеческим AA-амилоидным экстрактом на планшете.

Значения IC<sub>50</sub> (концентрация AA (по весу), при которых на 50% уменьшалось связывание mAb) для мышинового AEF в растворе составляли около 20 мкг/мл, тогда как для человеческого AA значения были от 6 до 44 раз выше (напротив, значения EC<sub>50</sub> для человеческого AA были только в 7 раз ниже, чем значения EC<sub>50</sub> для мышинового AA). Это может говорить о том, что антигенная детерминанта на амилоидных фибриллах в растворе является менее доступной в препаратах человеческого AA по сравнению с мышинным AA.

Как предполагалось, самая высокая концентрация AA-амилоида для достижения конкуренции потребовалась для mAb 7D8, которое показывало самую высокую относительную аффинность к человеческим и мышинным фибриллам AA, если они были адсорбированы на поверхности.

Пример XII. Радиомеченое mAb 7D8.

Эффективность радиомечения 7D8 определяли с помощью SDS-PAGE. Анализировали редуцированное и нативное mAb, белки визуализировали с использованием устройства для фосфор-визуализации. И цепи IgH, и цепи IgL включали метки <sup>125</sup>I, и достоверно отсутствовали полосы, связанные с фрагментацией или агрегацией.

Пример XIII. Визуализация AA-амилоида с использованием <sup>125</sup>I-меченого 7D8.

Для исследования *in vivo* локализации радиомеченого mAb 7D8 использовали три группы мышей: трансгенные IL-6; индуцированные AgNO<sub>3</sub>/AEF и контрольные без амилоида (WT). Визуализация с помощью СPECT/СТ показала, что mAb <sup>125</sup>I-7D8 находились в AA-амилоидных депо мышей в селезенке и печени, о чем свидетельствует накопление радиомеченых mAb в этих тканях, относительно контрольных мышей, у которых отмечена только низкая активность кровяного пула в печени и свободный йодид в щитовидной железе.

В отличие от этих мышей, захват свободного йодида обнаружен в щитовидной железе у мышей после введения AgNO<sub>3</sub>, некоторая активность в печени, но основная зона связывания <sup>125</sup>I-7D8 выявлена в месте подкожной инъекции AgNO<sub>3</sub> (нижняя правая часть спины). Активность в этой зоне четко контурирована рентген-поглощающим раствором серебра, что обнаруживают с помощью компьютерной томографии КТ. Показано, что у мышей TRIAD антитело mAb 7D8 связывается с AA-амилоидными депо и в печени и в селезенке в присутствии циркулирующего SAA, что подтверждается визуализацией СPECT.

А. Биораспределение <sup>125</sup>I-7D8 у мышей.

Через 48 ч после инъекции <sup>125</sup>I-7D8 обнаруживали радиоактивность в кровяном пуле, которая обусловлена относительно высоким захватом в легких (которые заполняются кровью при умерщвлении мышей). Необходимо отметить, что накопление mAb в печени и селезенке у мышей IL-6 указывает на присутствие амилоида. Отображения СPECT/СТ подтвердили распределение mAb в этих органах. Через 72 ч после инъекции значения кровяного пула слегка изменились, о чем свидетельствует неизменившаяся активность в сердце и легких по сравнению с мышами, которых умерщвляли через 48 ч, из-за относи-

тельно долгого периода полувыведения  $T_{1/2\text{bio}}$  этого mAb (около 60 ч). Отмечено значительное накопление радиомеченого mAb у мышей IL-6, которое коррелирует с полученными изображениями SPECT, демонстрирующими выраженный захват в селезенке и в меньшей степени в печени. Из других органов самым важным была печень (которая является зоной катаболизма IgG и источником sAA во время острофазового ответа). У мышей линии WT без воспалительной или амилоидной индукции в печени содержалось <6% ID/g, что сопоставимо с почкой и сердцем, где сигнал почти исключительно обусловлен кровяным пулом.

В. Авторадиографические и гистохимические исследования.

Чтобы определить, является ли увеличенное накопление  $^{125}\text{I}$ -7D8 в печени у мышей IL-6 и мышей AgNO<sub>3</sub> результатом захвата амилоида, проводили авторадиографический анализ печени, а также других тканей на катаболическое удаление или связывание с вновь синтезированным sAA.

На основе визуализации с помощью SPECT и измерений биораспределения предполагается, что наибольшее количество амилоида у трансгенных мышей IL-6 находится в печени и селезенке. Эта гипотеза была подтверждена окрашиванием срезов Конго красным, в которых наблюдали значительное количество амилоида во всей красной пульпе, а также в периваскулярных зонах и синусах печени. Дополнительно, менее заметные двупреломляющие депо присутствовали в почках и сердце. Распределение  $^{125}\text{I}$ -7D8 в этих тканях хорошо коррелировало с окрашиванием Конго красным и AA-реактивным материалом. Отсутствовало какое-либо накопление в гепатоцитах, в которых не было амилоида.

По данным биораспределения, у мышей после введения AgNO<sub>3</sub> выявлен большой захват  $^{125}\text{I}$ -7D8 в печени, чем в селезенке, что было неожиданным, так как печень не является нормальной структурой накопления AA у таких животных. Окрашивание Конго красным показало небольшое количество амилоида в единственной перифолликулярной области селезенки (верхний правый угол) и обширные периваскулярные депо в печени, и оба этих факта подтверждены авторадиографически. Дополнительно, в изображениях SPECT на участке подкожной инъекции AgNO<sub>3</sub> выявлена значительная концентрация  $^{125}\text{I}$ -7D8 (авторы также наблюдали этот факт при использовании меченого радиоактивным йодом SAP (сывороточного Р-амилоидного компонента) в качестве средства визуализации). В этом участке отсутствует амилоид (т.е. материал с двойным лучепреломлением Конго красного); однако он подвергался иммуноокрашиванию с помощью анти-AA mAb. Без связи с конкретной теорией, возможно, что mAb 7D8 локализуется в участках воспаления или "предамилоидных" участках (а также в зрелых амилоидных депо). В отличие от внушительного накопления 7D8 в органах мышей IL-6, в тканях контрольных мышей был выявлен слабый след или отсутствие следа в любом органе, кроме кровяного пула. В срезах любого органа этих контрольных мышей при окрашивании Конго красным амилоид не был обнаружен.

С. Фармакокинетика  $^{125}\text{I}$ -7D8.

После инъекции радиомеченого антитела 7D8 определяли скорость исчезновения молекулы и периоды полувыведения  $T_{1/2\text{bio}}$ , полученные данные приведены в табл. 7. Определено, что  $T_{1/2\text{bio}}$  у 7D8 составлял около 60 ч, что сопоставимо с  $T_{1/2\text{bio}}$  IgG2b мышиного mAb (примечание: 7D8 происходит из подкласса IgG2b). Незначительно более быстрое выведение  $^{125}\text{I}$ -7D8 у мышей IL-6 (TRIAD) было несущественным. По этим данным на скорость экскреции не влияет удержание mAb в амилоидной ткани более чем на 72 ч, о чем свидетельствуют данные SPECT.

Таблица 7

Анализ полувыведения $^{125}\text{I}$ -7D у мышей					
Мыши	A (S.E.)	K (S.E. $\times 10^{-4}$ )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2\text{ bio}}$	$t_{1/2\text{ eff}}$
IL-6, 48ч	191.7 (2.96)	0.0117 (7.0)	0.98	59.2 ч	56.2
IL-6, 72ч	175.2 (3.99)	0.012 (8.9)	0.97	57.7 ч	
AgNO <sub>3</sub> , 48ч	181.0 (1.99)	0.0106 (4.9)	0.99	65.3 ч	61.1
AgNO <sub>3</sub> , 72ч	174.1 (2.97)	0.0112 (5.8)	0.98	62.2 ч	
Ctrl, 48ч	185.1 (3.19)	0.0108 (7.6)	0.98	64.3 ч	61.3
Ctrl, 72ч	185.1 (3.09)	0.0109 (5.6)	0.98	63.7 ч	

1. Способ идентификации средств для профилактики или лечения амилоидоза, в котором используют трансгенных мышей или мышей TRIAD.

Методики изготовления средств описаны авторами Schenk et al. Nature, 400:173-177. Средства эмульгировали в соотношении 1:1 (об./об.) с полным адьювантом Фрейнда для первой иммунизации трансгенных мышей, с последующим усилением полным адьювантом Фрейнда через 2 недели и ежемесячно после этого. Инъекции ФБР проводили по той же схеме и для контроля мышам вводили смесь 1:1 ФБР/адьюванта. Сравнивали продолжительность жизни трансгенных мышей, чтобы определить эффективность средств для профилактики амилоидоза AA-типа посредством увеличения срока жизни животного.

## 2. Гистопатология.

Для световой и поляризующей микроскопии готовили срезы ткани толщиной от 4 до 6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ) и свежеприготовленным щелочным раствором Конго красного соответственно. Для электронной микроскопии образцы помещали в смолу Epon (Ted Pella, Redding, Калифорния), готовили срезы и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEOL IOOS. См. Ludlage et al. *Vet. Pathol.* 42:117-124 (2005).

## 3. Иммуногистохимия.

Помещенные в парафин срезы ткани (6 мкм толщиной) нарезали на микротоме, закрепляли на слайдах с покрытием поли-L-лизинном, высушивали в течение ночи при комнатной температуре и удаляли парафин. Выполняли иммуноокрашивание, используя комплексную авидин-биотин (ABC-elite) технологию, как описано ранее. Первичными антителами являлись мышьяная античеловеческая А-амилоидная (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY) и антимишьяная SAA поликлональные антисыворотки. В качестве вторичных антител использовали конъюгат аффинно-очищенного лошадиного антимишьяного иммуноглобулина-G (IgG) с пероксидазой хрена (Vector Laboratories, Burlingame, Калифорния) или конъюгаты козьего антикроличьего, антимишьяного или антикрысиного IgG с пероксидазой хрена (BioRad Laboratories, Richmond, Калифорния).

## 4. Количественное определение SAA анализом ELISA.

Концентрации SAA измеряли твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) с использованием многовидового комплекта ELISA SAA (Multispecies SAA ELISA kit) согласно инструкциям изготовителя (Biosource, Camarillo, Калифорния). Стандартные кривые были подготовлены с использованием известного количества человеческого белка SAA, и поглощение измеряли при 405 нм на планшетном ридере модели 4450 BioRad (Fullerton, Калифорния).

## 5. Изучение метаболизма с помощью радиосцинтиграфии SAP у мышей.

SAP подвергали окислительному йодированию с  $^{125}\text{I}$  (2-5 MBq/мг) с использованием N-бромсукцинимидом. Мышам в возрасте 6-12 недель внутривенно вводили от 2 до 10 мкг  $^{125}\text{I}$ -SAP в 200 мкл. Точно отмеренные пробы крови из хвоста (от 0,01 до 0,04 г) брали в определенные интервалы времени и проводили подсчет радиоактивности с осаждением трихлоруксусной кислотой в каждой партии в конце каждого эксперимента вместе со стандартными аликвотами введенного меченого вещества. Pepys et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5602-5606 (1994).

## 6. Изучение метаболизма с помощью радиосцинтиграфии SAP и анализ визуализации у человека.

Для применения у человека выделяли SAP из плазмы единственного нормального официального донора и подвергали окислительному йодированию с  $^{125}\text{I}$  (2-5 MBq/мг) или  $^{123}\text{I}$  (110 MBq/50 мкг белка) с использованием N-бромсукцинимидом. После инъекции  $^{123}\text{I}$  SAP полученные данные обрабатывали в гамма-камере IGE Starcam (IGE Medical Systems, Slough, Великобритания). Выведение  $^{125}\text{I}$ -меченого SAP изучали у здоровых людей и больных амилоидозом AA-типа. Pepys et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5602-5606 (1994).

## 7. Экстракция и очистка амилоида.

Для экстракции амилоида из ткани применяли способы, описанные авторами Pras, et al. См. Pras et al. *J. Clin. Invest.* 47:924-933 (1968) Коротко, образец печени или тканей из других органов, полученных при вскрытии трупа и сохраняемых при  $-80^{\circ}\text{C}$ , гомогенизировали с холодным солевым раствором в ледяной ванне с использованием Omni-миксера (Omni International, Waterbury, Коннектикут). Экстракт центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  и осадок повторно экстрагировали еще дважды с холодным солевым раствором, один раз с 0,1 М цитратно-натриевым Трис-буферным раствором с уровнем pH 8,0 и затем снова с солевым раствором, пока показатели A280 супернатанта не стали  $<0,10$ . Полученный осадок гомогенизировали с холодной дистиллированной водой и смесь центрифугировали при 35000 об/мин в течение 3 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем полученный из водного экстракта осадок лиофилизировали.

## 8. Поверхностный плазмонный резонанс.

Кинетику связывания измеряли с помощью устройства BIAcore X. Фибриллы, подготовленные из Vλ6 Wil, быстро разрушали ультразвуком с соникатором образцов и затем соединяли с чипом CM-5, используя химию аминов согласно протоколу BIAcore. Для этой методики применяют EDC и нормальную человеческую сыворотку NHS для активации карбоксильной группы на чипе, для соединения со свободными аминокетильными группами на фибриллах. Соединение проводят в буфере NaOAc с уровнем pH 4,0 при концентрации 100 мкг/мл. Контрольный канал подвергали "пробному соединению", и оба канала реагировали с этаноламином для насыщения непрореагировавших участков. Были соединены около 16000 RU фибрилл Vλ6 Wil.

Сенсограммы проводили по методике в буфере HBS-EP от компании BIAcore в 20 мкл/мин в FcI (фибриллы Vλ6 Wil) минус Fc-2 (контроль). В образцы, содержащие mAb или mAb вместе с пептидными ингибиторами, вводили инъекции (70 мкл) и получали сенсограммы с использованием функции задержки промывания в течение 200 с. Данные анализировали с программным обеспечением BIAevaluation, используя 1:1 модель Ленгмюра с коррекцией действия массы.

### 9. Микро-SPECT/СТ.

В двух группах по три мыши в каждой мышам подкожно между лопатками вводили 50 мг экстракта человеческого AL-амилоида. Через 7 дней в одной группе мышам внутривенно путем в/в инъекции в хвостовую вену вводили 300  $\mu\text{Ci}$ ,  $^{125}\text{I}$  меченого mAb 7D8. Второй группе вводили равное количество мышинового mAb MOPC 31C в качестве контроля. Через 72 ч мышей умерщвляли передозировкой изофлурана и получали отображения SPECT/СТ. Для обеспечения повышения контрастности сосудов на КТ-отображениях мышам за 5 мин до сканирования в/в вводили 200 мкл Фенестра VC™ (Fenestra VC™ Advanced Research Technologies, Монреаль, Канада).

Данные SPECT получали с помощью сканера MicroCAT II + SPECT с технологией двойного отображения (SPECT dual modality imaging platform (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN)), дающей возможность субмиллиметрового разрешения, оборудованного коллиматором с точечной апертурой диаметром 0,5 мм. Для получения отображения два датчика (состоящие из мультианодной фотоумножительной трубки Хамамацу R2486-0250 диаметром 50 мм, присоединенной к кристаллической решетке CsI (Tl) 1×1×8 мм, закрепленной на гриде 1,2 мм<sup>2</sup>), помещали примерно в 45 мм от центра вращения. Каждый набор данных SPECT содержал 45 проекций, полученных на 360° в течение около 50 мин. Реконструкцию изображений проводили с использованием алгоритма максимизации ожидания максимального правдоподобия (EM-ML).

После сбора данных SPECT были получены изображения компьютерной томографии (КТ) высокого разрешения. Сканер MicroCAT II имеет геометрию конического луча с круговой орбитой, оборудованной микрофокусными рентгеновскими источниками с пиковым напряжением в киловольтах 20-80 kVp и с размером зоны визуализации 90×60 мм, с использованием CCD-матричного детектора 2048×3072, оптически соединенного с люминесцентным экраном minR посредством оптоволоконной связи. Каждый набор данных КТ состоял из 360 проекций с азимутом 1°, который получали в течение 8 мин. Изображения реконструировали в реальном времени на изотропических вокселях 77 мкм с использованием алгоритма обратных проекций Feldkamp.

Для облегчения совместной регистрации реконструированных изображений SPECT и КТ на визуализируемое основание помещали герметичные источники Co-57. Визуализировали пакеты данных микро-SPECT и КТ и регистрировали их совместно вручную с помощью пакета программ 3-D анализа отображений (Amira, Версия 3.1: Mercury Computer Systems).

### 10. Биораспределение.

У мышей забирали образцы печени, селезенки, почки, сердца, легкого и имплантированных амилоидных опухолей (а именно, амилоидомы) и помещали в тарированные флаконы, взвешивали и измеряли радиоактивность. Первичные значения индекса выражали как % введенной дозы на 1 г ткани (ID/г %).

### 11. Авторадиография.

Срезы толщиной 6 мкм, отрезанные от фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков тканей, полученных от мышей, умерщвленных через 72 ч после инъекций  $^{125}\text{I}$ -7D8, наносили на слайды для микроскопа Probond (Fisher Scientific), опускали в эмульсию NTB-2 (Eastman Kodak), сохраняли в темноте и обрабатывали после экспозиции в течение 24 ч. Срезы подвергали контр-окрашиванию гематоксилином и эозином (ГЭ), накрывали со сдвигом с использованием Permount (Fisher Scientific) и исследовали световой микроскопией. Дополнительно, следующие слайды окрашивали щелочным Конго красным и наблюдали в поляризованном свете. Наконец, третий слайд подвергали иммуноокрашиванию, используя в качестве первичного реактива AA-реактивное mAb по настоящему изобретению. Применяли цифровую камеру для изображений с микроскопа и оценивали их с использованием программного пакета анализа изображений (Image Pro Plus, Media, Cybernetics).

### Пример XIV. Создание гуманизированного антитела 2A4 и 7D8.

Гуманизированные антитела 2A4, 7D8 и 8G9 изготавливали путем трансплантации мышинных 2A4, 7D8 и 8G9 CDR на человеческие акцепторные каркасы согласно способам, известным в данной области техники. Обратные мутации осуществляли для уменьшения антигенности при сохранении связывающей аффинности. Варибельные области легкой цепи и тяжелой цепи мышинных 2A4 представляли собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152 и остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154 соответственно. Варибельные области легкой цепи и тяжелой цепи 7D8 представляли собой остатки 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153 и остатки 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154 соответственно. Варибельные области легкой цепи мышинных 2A4 и 8G9 идентичны и отличаются от варибельной области легкой цепи 7D8 по единственному остатку в CDR1. Варибельные области тяжелой цепи каждого из 2A4, 7D8 и 8G9 были идентичными.

Варибельная область каппа (V<sub>κ</sub>) из 2A4 и 7D8 относится к мышинной подгруппе 2, которая соответствует человеческой подгруппе 2, и варибельная область тяжелой цепи (V<sub>h</sub>) относится к мышинной подгруппе 3, которая соответствует человеческой подгруппе 3 (Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242). CDR-L1 включает 16 остатков и принадлежит к каноническому классу 4 из V<sub>κ</sub>. CDR-L2 включает 7 остатков и относится к классу 1 из V<sub>κ</sub>. CDR-L3 включает 9 остатков и относится к классу 1 из V<sub>κ</sub>. См. Martin A.C., Thornton J.M. (1996), J. Mol.

Biol. 263, 800-15. Лейцин в положении 27 в 7D8 является довольно необычным, и глутамин в 2A4 является более типичным. На модели показано, что боковая цепь находится на поверхности связывающего сайта и поэтому должна быть важной для связывания антигена. CDR-H1 включает пять остатков и относится к классу 1, и CDR-H2 включает 19 остатков и относится к классу 4 (Martin & Thornton, 1996). Область CDR-H3 не имеет каких-либо канонических классов, но в петле из восьми остатков, вероятно, имеется перекрученное основание согласно правилам Shirai et al. (1999), FEBS Lett. 455, 188-97. В модели она является консервативной, вместе с тем, конформация верхушки CDR-H3 может быть разной. Остатки в области контакта между доменами V<sub>k</sub> и V<sub>h</sub> представляют собой остатки, обычно выявляемые для 2A4 V<sub>k</sub>, 7D8 V<sub>k</sub> и 2A4 V<sub>h</sub>.

Чтобы найти структуры, способные направить выбор обратных мутаций, проводили поиск в базе данных PDB (Deshpande et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7). Поиск по статически определимой базе данных последовательностей белка Национального центра биотехнологической информации NCBI позволил выбрать подходящие человеческие структуры для трансплантации мышиных CDR. Для области V<sub>k</sub> была выбрана человеческая легкая цепь каппа с кодом доступа NCBI BAC01562 (gi:21669075) (SEQ ID NO: 166). Она имеет одинаковую длину с CDR-L3 и относится к человеческой зародышевой линии VKIIA 19/A3 и к подгруппе 2 человеческой области каппа. Также была найдена подобная структура, отличающаяся только по J-области, с кодом доступа NCBI BAC01733 (gi:21669417) (SEQ ID NO: 167). BAC01562 использовали в качестве каркаса для 2A4 V<sub>k</sub> и BAC01733 использовали как каркас для 7D8 V<sub>k</sub>. Для области V<sub>h</sub> использовали тяжелую цепь человеческого Ig AAC51024 (gi:1791061) (SEQ ID NO: 165). См. Glas et al. (1997), Clin. Exp. Immunol. 107:372-380. Она относится к человеческой зародышевой линии VH3-72 и подгруппе 3 человеческой тяжелой цепи.

Вариабельные области легкой цепи типичного гуманизированного антитела 2A4 представляют собой SEQ ID NO: 155, 156 и 157. Вариабельные области легкой цепи типичного гуманизированного 7D8 представляют собой SEQ ID NO: 158, 159, 160, 174, 175 и 176. Вариабельные области тяжелой цепи типичного гуманизированного 2A4/7D8 представляют собой SEQ ID NO: 161, 162 и 163. См. фиг. 36A-36E.

Типичные гуманизированные антитела по изобретению включают антитела, имеющие вариабельные области легкой цепи, выбранные из одного из остатков 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, остатков 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153 и SEQ ID NO: 155, 156, 157, 159, 160, 174, 175 и 176; и вариабельные области тяжелой цепи, выбранные из одного из остатков 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 161, 162 и 163.

Пример XV. Терапевтические эффекты mAb 2A4 у мышей с тяжелым системным амилоидозом AA-типа.

Терапевтическую эффективность mAb 2A4 оценивали у мышей H2/huIL-6 с тяжелым системным амилоидозом. У трансгенных H2/huIL-6 мышей, которые конститутивно экспрессируют трансгенный человеческий IL-6, подтверждается быстрое и необратимое развитие системного амилоидоза AA-типа. В первом и втором исследовании мышам вводили изотипически сходное mAb TУ-11, которое не имеет активности у мышей и использовалось в качестве контроля. Перед введением фактора усиления амилоида для индукции AA у мышей H2/huIL-6 забирали образцы крови через ретроорбитальную пазуху, готовили сыворотку и определяли концентрации SAA с использованием коммерчески доступного комплекта ELISA. Были получены следующие репрезентативные значения: 2196,7, 823,91, 1415,00, 1673,01, 814,53, 1088,18, 736,34, 1546,35, 953,70, 886,46 мкг/мл при среднем значении = 1213,4±478 мкг/мл.

В начале второго исследования (неделя 0) мышам H2/huIL-6 в/в вводили 100 мкг фактора усиления амилоида (AEF). После индукции патологии AA путем введения AEF мышам подкожно в другую конечность вводили пять инъекций по 100 мкг mAb 2A4 (13 животных) или TУ11 (11 животных). Лечение начинали примерно через 1 неделю после инъекции AEF. Выживаемость животных в каждой группе лечения регистрировали и анализировали. Результаты показаны в табл. 7. Только 45% мышей, которым вводили mAb TУ11, выжили до конца исследования. Напротив, ни одна из мышей, получавших 2A4, не погибла в течение исследования. Анализ данных выживаемости с использованием стандартных методик показал существенное различие в кривых выживания ( $P < 0,0025$ ) в обеих группах. Средняя выживаемость мышей с введением TУ11 составляла 41 день, что сопоставимо с данными предыдущего исследования (38,5 дней).

Таблица 7

Процент выживших мышей		
Дни после инъекции	Введение ТУ11	Введение 2А4
0	100.00	100.00
22	81.82	100.00
33	72.73	100.00
37	63.64	100.00
41	45.45	100.00
42	45.45	100.00

На 6 неделе после введения АЕФ у мышей забирали кровь и забивали и их органы забирали для дальнейшего анализа. Для определения количества амилоида в печени и селезенке проводили микроскопию в поляризованном свете, визуализировали двойное лучепреломление с окрашиванием Конго красным и регистрировали в цифровой форме. Область двупреломляющего материала определяли путем отбора (с использованием методики спектральной сегментации) и подсчета количества амилоид-связанных пикселей. Индекс амилоидной нагрузки (АВІ), как меру содержания амилоида, выражали как процент занятой амилоидом области в каждом органе. Определение количества амилоида в печени и селезенке у мышей, получавших 2А4 и ТУ11, не показало существенного различия между указанными двумя видами лечения. Однако при сравнении мышей, получавших 2А4, у мышей, которым вводили ТУ11 и выжившим к 42 дню, не выявлено развития патологических признаков или такого распределения АА-амилоида, которое приводит к заболеванию.

Также в течение исследования на выживаемость контролировали амилоидную гепатоселезеночную массу, чтобы оценить увеличение амилоидной нагрузки, которая коррелирует с заболеваемостью.

В третьем исследовании проводили сравнение mAb 2А4 с изотипически сходным mAb JH70, о реактивности которого у мышей не сообщалось. Дополнительно, на протяжении всего периода лечения проверяли химические показатели крови и другие параметры. В этом исследовании использовали самцов и самок мышей H2/huIL-6, рожденных в период между 8/1/08 и 9/7/08. У 23 самок мышей и 16 самцов мышей осуществляли забор крови через ретроорбитальную пазуху. Цельную кровь использовали для химического анализа азота мочевины крови (АМК) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), чтобы оценить функции почек и печени, с использованием VetScan VS2 (Abaxis, Union City, Калифорния). Одновременно измеряли концентрацию в сыворотке 12 других белков и анализируемых веществ. Проводили общий анализ крови (СВС) с использованием оборудования VetScan HM5. Дополнительно, каждой мышце вводили низкие дозы (-50-60  $\mu\text{Ci}$ ) человеческого сывороточного амилоидного компонента Р с радиоактивным йодом ( $^{125}\text{I}$ -SAP) в 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина для оценки амилоидной нагрузки у мышей до инициирования патологического процесса. Измеряли процент  $^{125}\text{I}$ -SAP, остаточного через 24 ч после инъекций (П/И), путем помещения каждой мыши в калибратор дозы. Показателем амилоидного заболевания было более высокое, чем наблюдаемое у нетрансгенных (контрольных) мышей, удержание  $^{125}\text{I}$ -SAP. Наконец, использовали сыворотку для измерения концентрации сывороточного амилоидного белка (sAA) с помощью коммерческого набора для анализа ELISA. Итоги полученных перед лечением данных, некоторых химических показателей крови и результаты лечения, приведенные для каждой мыши, показаны в табл. 8 и 9.



Таблица 8

Сводные данные показателей до лечения и введения mAb  
для каждого животного

Мышь №	Концентрация SAA, (мкг/мл)	Пол	Дата рождения	Удержание 125I-SAP (%)	Лечение (группа №)
3488	360	F	8/1/08	9	2A4 (1)
3489	996	F	8/1/08	29	2A4 (1)
3490	472	F	8/1/08	10	2A4 (1)
3492	2068	M	8/1/08	13	2A4 (1)
3493	1740	M	8/1/08	11	JH70 (1)
3494	1272	M	8/1/08	10	JH70 (1)
3495	1436	M	8/1/08	13	JH70 (1)
3496	2080	M	8/1/08	9	2A4 (1)
3498	268	M	8/1/08	9	2A4 (1)
3500	700	F	8/11/08	11	JH70 (1)
3501	ND	F	8/11/08	9	JH70 (1)
3503	1040	F	8/11/08	11	JH70 (1)
3504	960	F	8/11/08	10	JH70 (1)
3513 <sup>1</sup>	4400	M	8/13/08	60	2A4 (1)
3514 <sup>1</sup>	4400	M	8/13/08	40	2A4 (1)
3515	2800	M	8/13/08	13	2A4 (1)
3521	1480	M	8/18/08	11	2A4 (1)
3524	1680	M	8/18/08	9	2A4 (1)
3549	720	F	9/6/08	9	2A4 (2)
3550	760	F	9/6/08	9	2A4 (2)
3552 <sup>2</sup>	0	F	9/6/08	11	2A4 (2)
3553	1160	F	9/6/08	12	2A4 (2)
3558	1660	M	9/6/08	9	JH70 (2)
3559	3520	M	9/6/08	12	JH70 (2)
3562	1312	F	9/6/08	11	JH70 (2)
3563	1120	M	9/6/08	9	JH70 (2)
3564	2512	M	9/6/08	11	2A4 (2)
3565	1960	M	9/6/08	10	2A4 (2)
3567	1880	F	9/6/08	12	2A4 (2)
3570	792	F	9/7/08	13	2A4 (2)
3573	700	F	9/7/08	8	2A4 (2)
3577 <sup>2</sup>	0	F	9/7/08	10	2A4 (2)
3578 <sup>2</sup>	0	F	9/7/08	9	2A4 (2)
3579	1120	F	9/7/08	10	2A4 (2)
3580 <sup>2</sup>	0	F	9/7/08	8	JH70 (2)
3581	700	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3582	1680	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3583	804	F	9/7/08	9	JH70 (2)
3584	1040	F	9/7/08	14	JH70 (2)

<sup>1</sup> Гомозиготные по IL-6 животные с высокими уровнями SAA и возникновением амилоидного заболевания в начале жизни.

<sup>2</sup> Мыши дикого типа, без циркулирующего SAA и отсутствием амилоидной болезни.

Удержание 125I-SAP у этих животных считается нормальным и показывает отсутствие амилоидной нагрузки.

Таблица 9

Нормальные значения химических показателей крови у мышей H2/huIL-6

	АМК (мг/дл)		ГЛЮ (мг/дл)		АЛТ (ед/дл)		АЛБ (г/дл)		ОБ (г/дл)		ИГ (г/дл)	
	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец
Среднее значение	21.1	23.8	144.7	151.2	37.6	42.3	2.5	1.9	5.6	6.2	3.1	4.4
SD	4.0	2.7	14.0	17.6	16.3	24.3	0.3	0.4	0.2	0.6	0.4	0.6
n	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13	18	13
Высокий	28.0	30.0	184.0	179.0	79.0	105.0	3.0	2.6	6.0	7.4	3.7	5.8
Низкий	15.0	20.0	126.0	119.0	21.0	23.0	2.0	1.2	5.1	5.5	2.6	3.4
Средние	20.0	24.0	143.0	154.0	32.5	32.0	2.4	1.9	5.6	6.0	3.2	4.3

АМК - азот мочевины крови; ГЛЮ - глюкоза; АЛТ - аланинаминотрансфераза; АЛБ - альбумин; ОБ - общий белок сыворотки; ИГ - иммуноглобулин; F - самка; M - самец; SD - стандартное отклонение; n - число мышей, используемых для определения показателей.

В начале третьего исследования (неделя 0) все мыши из всей группы H2/huIL-6 внутривенно получили 100 мкг фактора усиления амилоида (1 мг/мл). Через 1 неделю после начала лечения каждой мыши подкожно вводили 100 мкг или mAb 2A4 или JH70, как описано в общих чертах в табл. 8. Инъекции mAb продолжались еженедельно в течение 7 недель.

Через 2 недели после введения АЕФ проводили анализы CBC, биохимии крови и сывороточного sAA путем забора крови через ретроорбитальную пазуху. В это время мышам в группе 1 также вводили около 60  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$ -SAP в БСА, как описано выше, для оценки накопления амилоида, что подтверждается удержанием радиомеченого SAP. У нескольких животных проявился побочный эффект экстремального стресса, и поэтому оценку амилоидной нагрузки с использованием  $^{125}\text{I}$ -SAP у них не продолжали. Результаты некоторых химических показателей крови, полученных через 2 недели после введения АЕФ, показаны в табл. 10.

Таблица 10

	АМК (мг/дл)		ГЛЮ (мг/дл)		АЛТ (ед/дл)		АЛБ (г/дл)		ОБ (г/дл)		ИГ (г/дл)	
	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец
Среднее значение	31.4	52.1	145.1	129.8	33.9	63.3	2.3	1.8	6.5	8.1	4.2	6.2
SD	24.3	39.1	16.6	25.6	6.9	30.6	0.3	0.5	1.0	1.7	1.1	1.5
n	15	13	15	13	15	13	15	13	15	13	15	12
Высокий	100.0	159.0	177.0	178.0	46.0	134.0	2.7	3.0	8.6	11.7	7.0	9.6
Низкий	16.0	20.0	104.0	82.0	22.0	32.0	1.7	1.0	5.2	6.0	3.1	4.5
Средние	22.0	31.0	150.0	120.0	32.0	54.0	2.3	1.7	6.5	7.5	4.0	6.0

АМК - азот мочевины крови; ГЛЮ - глюкоза; АЛТ - аланинаминотрансфераза; АЛБ - альбумин; ОБ - общий белок сыворотки; ИГ - иммуноглобулин; F - самка; M - самец; SD - стандартное отклонение; n - число мышей, используемых для определения показателей.

Через 8 недель после введения АЕФ у мышей производили заключительный забор крови и сразу после этого вводили около 200  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$ -SAP с использованием в качестве носителя 5% нормальную мышиную сыворотку. В ответ на это введение несколько животных проявили слегка необычное поведение, которое нормализовалось в течение 30 мин. Через 24 ч мышам вводили рентгеноконтрастное вещество для КТ (около 200 мкл в/в в хвостовую вену) и затем их умерщвляли путем передозировки изофлурана. Были получены томографические изображения одиночной фотонной эмиссии (СПЕКТ) и рентгеновские изображения (КТ) каждого животного. Производили забор органов, вычисляли количество радиоактивности в каждом образце, которое выражали в виде % введенной дозы на грамм ткани. Дополнительно, часть каждой ткани фиксировали в буферизованном формалине в течение ночи в препаратах для микро-томирования и проведения микроскопии.

В течение 7 недели клинических исследований две мыши были обнаружены мертвыми и трех мышей забили по причине малой вероятности их выживания в течение ночи и плохих показателей состояния организма (<2; связанных с потерей веса >15%). Мышей, проявивших побочные реакции на инъекцию  $^{125}\text{I}$ -SAP, и одну мыш, которую забили по причине осложнений в результате ретроорбитального кровотечения, не оценивали в части анализа выживаемости. Выживаемость мышей в каждой группе лечения mAb показана в табл. 11.

Таблица 11

% выживаемости мышей		
Дни после инъекции	Введение TУ11	Введение 2A4
0	100,00	100,00
41		100,00
42		100,00
53	85,71	100,00
55	71,43	100,00
56	64,29	100,00
57	64,29	100,00

Около 65% мышей с введением mAb JH70, которые могли войти в оценку, выжили до конца исследования. Напротив, ни одна из мышей с 2A4, которая могла войти в оценку, не умерла в течение этих 57 дней. Анализ данных выживаемости с использованием стандартных методик показал значительные отличия в кривых выживания (P=0,015, с использованием теста Мантел-Кокса и P=0,016 с использованием теста Грехана-Бреслау-Вилкоксона (Grehan-Breslow-Wilcoxon)).

Заключительные химические показатели крови анализировали в соответствии с препаратами, которые получала каждая мыш. Из-за отличий параметров средних значений, связанных с полом (самки и самцы) мышей H2/huIL-6 (в момент эвтаназии уровни АМК у самок мышей были выше, как при введении 2A4, так и при введении JH70), в табл. 12 включены только выжившие самки мышей.

Таблица 12

	АМК (мг/дл)		ГЛЮ (мг/дл)		АЛТ (ед/дл)		АЛБ (г/дл)		ОБ (г/дл)		ИГ (г/дл)	
	2А4	ЖН70	2А4	ЖН70	2А4	ЖН70	2А4	ЖН70	2А4	ЖН70	2А4	ЖН70
Среднее значение	60.7	73.3	107.8	100.1	45.5	119.7	2.3	2.2	9.2	9.1	7.0	7.1
SD	27.2	25.7	27.0	13.3	6.2	123.1	0.5	0.6	1.5	1.5	2.0	2.1
n	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0
Высокий	95.0	120.0	160.0	123.0	52.0	381.0	2.9	3.0	11.7	11.9	10.1	10.6
Низкий	17.0	36.0	83.0	83.0	35.0	33.0	1.5	1.2	7.2	7.5	4.3	5.3
Средние	66.5	70.0	99.5	98.0	46.5	65.0	2.2	2.1	9.1	8.9	7.1	6.2

АМК - азот мочевины крови; ГЛЮ - глюкоза; АЛТ - аланинаминотрансфераза; АЛБ - альбумин; ОБ - общий белок сыворотки; ИГ, иммуноглобулин; F - самка; М - самец; SD, стандартное отклонение; n - число мышей, используемых для определения показателей.

У мышей, которым вводили 2А4, выявлено снижение уровней азота мочевины крови в сыворотке и аланинаминотрансферазы по сравнению с мышами, которым вводили ЖН70. АМК и АЛТ представляют собой маркеры функции почек и печени соответственно, и снижение их уровней указывают на то, что функции органа, возможно, лучше сохранялись при введении 2А4.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с агрегированным амилоидным белком, включающий синтез или рекомбинантную экспрессию антитела и выделение антитела, причем способ отличается тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) вариабельную область легкой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 168, 169 и 170; или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 177, 169 и 170; и

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три области, определяющие комплементарность SEQ ID NO: 171, 172 и 173.

2. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из L87 и L90 (соглашение о нумерации по Kabat), который занят соответственно Y и F, причем остальная часть вариабельной области легкой цепи занята соответствующими остатками вариабельной области легкой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

3. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, +92 и +109 (линейной нумерации), который занят T, S, L, D, Q, K, Y, L, F и L соответственно, причем остальная часть вариабельной области легкой цепи занята соответствующими остатками вариабельной области легкой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

4. Способ по п.3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из +75 и +92 (линейной нумерации), который занят Y и F соответственно, причем остальная часть вариабельной области легкой цепи занята соответствующими остатками вариабельной области легкой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

5. Способ по п.2, в котором вариабельная область легкой цепи человеческого акцепторного иммуноглобулина представляет собой вариабельную область легкой цепи каппа-подгруппы 2 человека (соглашение о нумерации по Kabat).

6. Способ по п.5, в котором вариабельная область легкой цепи каппа-подгруппы 2 человека происходит из зародышевой линии человека VKIIA19/A3.

7. Способ по п.6, в котором вариабельная область легкой цепи V<sub>k</sub> человека содержит последовательность SEQ ID NO: 166 или остатки 23-134 последовательности SEQ ID NO: 167.

8. Способ по п.1, в котором вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152, остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153 или SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 или 176.

9. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из H37, H49, H70 и H93 (соглашение о нумерации по Kabat), который занят соответственно I, A, F или V, причем остальная часть вариабельной области легкой цепи занята соответствующими остатками вариабельной области тяжелой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

10. Способ по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из +10, +15, +19, +37,

+49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (линейной нумерации), который занят R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V или A соответственно, причем остальная часть варибельной области тяжелой цепи занята соответствующими остатками варибельной области тяжелой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

11. Способ по п.10, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один остаток каркасного участка тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из +37, +49, +73 и +99 (линейной нумерации), который занят I, A, F или V соответственно, причем остальная часть варибельной области тяжелой цепи занята соответствующими остатками варибельной области тяжелой цепи акцепторного иммуноглобулина человека.

12. Способ по п.9, в котором варибельная область тяжелой цепи акцепторного иммуноглобулина человека представляет собой варибельную область тяжелой цепи гамма-подгруппы 3 человека (согласение о нумерации по Kabat).

13. Способ по п.12, в котором варибельная область тяжелой цепи гамма-подгруппы 3 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 165.

14. Способ по п.1, в котором варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с остатками 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154 или SEQ ID NO: 161, 162 или 163.

15. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 152 или с остатками 20-131 последовательности SEQ ID NO: 153; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с остатками 20-138 последовательности SEQ ID NO: 154.

16. Способ по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 или 176; и варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, 162 или 163.

17. Способ по п.16, в котором варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155 и варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

18. Способ по п.16, в котором варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156 и варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

19. Способ по п.16, в котором варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157 и варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163.

HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	1	MKLLTGLVFC	SLVLGVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAA2 (SEQ ID NO: 99)	1	MKLLTGLVFC	SLVLSVSSRS	FFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	DMREANYIGS
HSAA3 (SEQ ID NO: 100)	1	MKLSTGIIFC	SLVLGVSSQG	WLTFPLKAAGQ	GAKDMWRAYS	DMKEANYKKS
HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	1	MRLFTGIVFC	SLVMGVTSES	WRSFFKEALQ	GVGDMGRAYw	DIMISNHQNS
HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFFGHG	A-----E
HSAA2 (SEQ ID NO: 99)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGA	WAAEVISNAR	ENIQRLTGHG	A-----E
HSAA3 (SEQ ID NO: 100)	51	DKYFHARGNY	DAVQRGPGGV	WATEVISDAR	ENVQRLTGdh	A-----E
HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	51	NRYLYARGNY	DAAQRGPGGV	WAAKLISRSR	vylqglidyy	lfgnsstvlE
HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	93	DSLADQAANE	WGRSGKDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA2 (SEQ ID NO: 99)	93	DSLADQAANK	WGRSGRDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA3 (SEQ ID NO: 100)	93	DSLACQATNK	WQSGKDPNH	FRPAGLPEKY		
HSAA4 (SEQ ID NO: 101)	101	DSKSNEKAE	WGRSGKDPDR	FRPDGLPKKY		

Фиг. 1

HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	1	mklltglvfc	slvlgvssrs	ffsflgeafd	gardmwrays	dmreanyigs
HAA1 (SEQ ID NO: 102)	1	-----	-----RS	ffsflgeafd	gardmwrays	dmreanyigs
HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	51	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFFGHG	AEDsladqaa
HAA1 (SEQ ID NO: 102)	33	DKYFHARGNY	DAAKRGPGGV	WAAEAISDAR	ENIQRFFGHG	AEDS-----
HSAA1 (SEQ ID NO: 98)	101	newgrsgkdp	nhfrpaglpe	ky		
HAA1 (SEQ ID NO: 102)		-----	-----			

Фиг. 2

036059

HSAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 99) 1 mklltglvfc slvlsvssRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS  
 HAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 103) 1 -----RS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS

HSAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 99) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEVISNAR ENIQRLTGHG AEDSladqaa  
 HAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 103) 33 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEVISNAR ENIQRLTGHG AEDS-----

HSAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 99) 101 nkwgrsgrdp nhfrpaglpe ky  
 HAA2 (alpha) (SEQ ID NO: 103) -----

Фиг. 3

HSAA3 (SEQ ID NO: 100) 1 mkllstgiifc slvlgvssQG WLTLFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) 1 -----QG WLTLFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS

HSAA3 (SEQ ID NO: 100) 51 DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDSlaqgat  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) 33 DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDS-----

HSAA3 (SEQ ID NO: 100) 101 nkwgqsgkdp nhfrpaglpe ky  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) -----

Фиг. 4

HSAA4 (SEQ ID NO: 101) 1 mrlftgivfc slvmgvtsES WRSFFKEALQ GVGDMGRAYW DIMISNHQNS  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) 1 -----ES WRSFFKEALQ GVGDMGRAYW DIMISNHQNS

HSAA4 (SEQ ID NO: 101) 51 NRYLYARGNY DAAQRGPGGV WAAKLISR SRVYLQGLIDY LFGNSstvl  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) 33 NRYLYARGNY DAAQRGPGGV WAAKLISR SRVYLQGLIDY LFGNS-----

HSAA4 (SEQ ID NO: 101) 101 dsksnkaee wgrsgkdpdr frpdgplpky  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) -----

Фиг. 5

HAA1 (SEQ ID NO: 102) 1 RSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG  
 HAA2 (SEQ ID NO: 103) 1 RSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) 1 QGWLTLFLKAA GQGAKDMWRA YSDMKEANYK KSDKYFHARG NYDAVQRGPG  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) 1 BSWRSFFKEA LQGVGDMGRA YWDIMISNHQ NSNRYLYARG NYDAAQRGPG

HAA1 (SEQ ID NO: 102) 51 GVWAAEAISD ARENIQRF-- ---FGHGA-- -EDS  
 HAA2 (SEQ ID NO: 103) 51 GAWAAEVISN ARENIQRL-- ---TGHGA-- -EDS  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) 51 GVWATEVISD ARENVQRL-- ---TGdha-- -EDS  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) 51 GVWAAKLISR SRVYLQGLid yylFGNSstvl LEDS

Фиг. 6

HAA1 (SEQ ID NO: 102) 70 GHGAEDS  
 HAA2 (SEQ ID NO: 103) 70 GHGAEDS  
 HAA3 (SEQ ID NO: 104) 70 GdhaEDS  
 HAA4 (SEQ ID NO: 105) 78 stvlEDS

Фиг. 7

Мышиная SAA1 (SEQ ID NO: 106) 1 MKLLTSLVFC SLLLVGCHGG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS  
 Мышиная SAA2 (SEQ ID NO: 107) 1 MKLLTSLVFC SLLLVGCHGG FFSFIGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG  
 Мышиная SAA3 (SEQ ID NO: 108) 1 MKPSTAILLC ILILGVDSQR WVQFMKEAGQ GSRDMWRAYS DMKKANWKNS  
 Мышиная SAA4 (SEQ ID NO: 109) 1 MRLATVIVLC SLFLGVSGDG WYSFFREAVQ GTWDLWRAYR DnLEANYQNA

Мышиная SAA1 (SEQ ID NO: 106) 51 DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQE----- FFG---RGHE  
 Мышиная SAA2 (SEQ ID NO: 107) 51 DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQE----- FFG---RGHE  
 Мышиная SAA3 (SEQ ID NO: 108) 51 DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR EAVQK----- FTG---HGAE  
 Мышиная SAA4 (SEQ ID NO: 109) 51 DQYFYARGNY EAQRGSGGI WAAKIISTR KYFqgllnry YFGirnHGLE

Мышиная SAA1 (SEQ ID NO: 106) 93 DTIADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLPDKY  
 Мышиная SAA2 (SEQ ID NO: 107) 93 DTMADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLPAKY  
 Мышиная SAA3 (SEQ ID NO: 108) 93 DSRADQFANE WGRSGKDPNH FRPAGLPKRY  
 Мышиная SAA4 (SEQ ID NO: 109) 101 TLQATQKAE E WGRSGKPNH FRPEGLPEKF

Фиг. 8

MSAA1 (SEQ ID NO: 106) 1 mklltstvlfc slllgvchgG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS  
 MAA1 (SEQ ID NO: 110) 1 -----G FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS

MSAA1 (SEQ ID NO: 106) 51 DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQEFFGRG HEDTiadqea  
 MAA1 (SEQ ID NO: 110) 32 DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQEFFGRG HEDT-----

MSAA1 (SEQ ID NO: 106) 101 nrhrsgkdp nyyrppglpd ky  
 MAA1 (SEQ ID NO: 110) -----

Фиг. 9

036059

```
MSAA2 (SEQ ID NO: 107)      1  mklitlslvfc slllgvchgG FFSFIGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      1  -----G FFSFIGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG

MSAA2 (SEQ ID NO: 107)      51  DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFQEFFFRG HEDTmadqea
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      32  DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFQEFFFRG HEDT-----

MSAA2 (SEQ ID NO: 107)      101 nrhgrsgkdp nyyrppglpa ky
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      -----
```

Фиг. 10

```
MSAA3 (SEQ ID NO: 108)      1  mkpsiaailc ililgvdsqr wvqfmkEAGQ GSRDMWRAYS DMKKANWKNS
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      1  -----EAGQ GSRDMWRAYS DMKKANWKNS

MSAA3 (SEQ ID NO: 108)      51  DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR EAVQKFTGHG AEDSradqfa
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      25  DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR EAVQKFTGHG AEDS-----

MSAA3 (SEQ ID NO: 108)      101 newgrsgkdp nhfrpaglpk ry
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      -----
```

Фиг. 11

```
MSAA4 (SEQ ID NO: 109)      1  mrlatvivlc slflgvsgdg WYSFFREAVQ GTWDLWRAYR DNLEANYQNA
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      1  ----- WYSFFREAVQ GTWDLWRAYR DNLEANYQNA

MSAA4 (SEQ ID NO: 109)      51  DQYFYARGNY EAQQRGSGGI WAAKIISTSR KYFQGLLNRY YFGIRNHGLE
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      31  DQYFYARGNY EAQQRGSGGI WAAKIISTSR KYFQGLLNRY YFGIRNHGLE

MSAA4 (SEQ ID NO: 109)      101 TLqatqkaee wgrsgknpnh frpeglpekf
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      81  TL-----
```

Фиг. 12

```
MAA1 (SEQ ID NO: 110)      1  GFFSFVHEAF QGAGDMWRAY TDMKEANWKN SDKYFHARGN YDAAQRGPGG
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      1  GFFSFIGEAF QGAGDMWRAY TDMKEAGWKD GDKYFHARGN YDAAQRGPGG
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      1  -----EAG QGSRDMWRAY SDMKKANWKN SDKYFHARGN YDAAARRGPGG
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      1  -WYSFFREAV QGTWDLWRAY RDNLEANYQN ADQYFYARGN YEAQQRGSGG

MAA1 (SEQ ID NO: 110)      51  VWAAEKISDG REAFQE---- -FFG---RGH EDT
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      51  VWAAEKISDA RESFQE---- -FFG---RGH EDT
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      44  AWAAKVISDA REAVQK---- -FTG---HGA EDS
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      50  IWAAKIISTS RKYFQgllnr yYFGirnhGL ETL
```

Фиг. 13

```
MAA1 (SEQ ID NO: 110)      69  GRGHEDT
MAA2 (SEQ ID NO: 111)      69  GRGHEDT
MAA3 (SEQ ID NO: 112)      62  GHGAEDS
MAA4 (SEQ ID NO: 113)      76  nHGLETL
```

Фиг. 14

```
HSAA1 (SEQ ID NO: 98)       1  MKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS
MSAA1 (SEQ ID NO: 106)     1  MKLLTSLVFC SLLLGVCHGG FFSFVHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS

HSAA1 (SEQ ID NO: 98)       51  DKYFHARGNY DAAKRGPGGV WAAEAISDAR eniQRFFFGH AEDSLADQAA
MSAA1 (SEQ ID NO: 106)     51  DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR eafQEFFFRG HEDTIADQEA

HSAA1 (SEQ ID NO: 98)       101 NEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY
MSAA1 (SEQ ID NO: 106)     101 NRHGRSGKDP NYRPPGLPD KY
```

Фиг. 15

```
HAA1 (SEQ ID NO: 102)      1  rsFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYi gSDKYFHARG NYDAAKRGPG
MAA1 (SEQ ID NO: 110)      1  g-FFSFVHEA FQGAGDMWRA YTDMKEANWk nSDKYFHARG NYDAAQRGPG

HAA1 (SEQ ID NO: 102)      51  GVWAAEAISD AREniQRFFG HGAEDS
MAA1 (SEQ ID NO: 110)      50  GVWAAEKISD GREafQEFFG RGHEDT
```

Фиг. 16

```
HAA1 (SEQ ID NO: 102)      1  GHGAEDS
MAA1 (SEQ ID NO: 110)      1  GRGHEDT
```

Фиг. 17

```

HSAА1альфа (SEQ ID NO: 114) 1 mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS
HSAА1бета (SEQ ID NO: 115) 1 mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS
HSAА1гамма (SEQ ID NO: 116) 1 mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS

HSAА1альфа (SEQ ID NO: 114) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHG AEDSLADQAA
HSAА1бета (SEQ ID NO: 115) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEIVSDAR ENIQRFPGHD AEDSLADQAA
HSAА1гамма (SEQ ID NO: 116) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHD AEDSLADQAA

HSAА1альфа (SEQ ID NO: 114) 101 NEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY
HSAА1бета (SEQ ID NO: 115) 101 NEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY
HSAА1гамма (SEQ ID NO: 116) 101 NEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY
    
```

Фиг. 18

```

HSAА2альфа (SEQ ID NO: 114) 1 mKLLTGLVFC SLVLSVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DmREANYIGS
HSAА2бета (SEQ ID NO: 115) 1 mKLLTGLVFC SLVLSVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DmREANYIGS

HSAА2альфа (SEQ ID NO: 114) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEIVSNAR ENIQRLTGHG AEDSLADQAA
HSAА2бета (SEQ ID NO: 115) 51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEIVSNAR ENIQRLTGRG AEDSLADQAA

HSAА2альфа (SEQ ID NO: 114) 101 NKWGRSGRDP NHFRPAGLPE KY
HSAА2бета (SEQ ID NO: 115) 101 NKWGRSGRDP NHFRPAGLPE KY
    
```

Фиг. 19

```

                                10          20          30          40
Человеческая (SEQ ID NO: 119): RSFFSFLGEA   FDGARDMWRA   YSDMREANYI   GSDKYFHARG
Мъшинная (SEQ ID NO: 120): G FFSFIGEA   FQGAGDMWRA   YTDMKEAGWK   DGDKYFHARG
Шарпей (SEQ ID NO: 121): E WYSFVGEA   AQGAWDMMLRA   YSDMREANYK   NSDKYFHARG

                                50          60          70          80
Человеческая (SEQ ID NO: 119): NYDAAKRGPG   GVWAAEAISD   ARENIQRFFG   HGAEDSLADQ
Мъшинная (SEQ ID NO: 120): NYDAAQRGPG   GVWAAEKISD   ARESFQEFFG   RGHEDTMADQ
Шарпей (SEQ ID NO: 121): NYDAAQRGPG   GAWAAKVISD   ARENSQRDSG   HGAEDSKADQ

                                ITDLLRFG

                                90          100          104
Человеческая (SEQ ID NO: 119): AANEWGRSGK   DPNHFRPAGL   PEKY
Мъшинная (SEQ ID NO: 120): EANRHGRSGK   DPNYYRPPGL   PAKY
Шарпей (SEQ ID NO: 121): AANEWG
    
```

Фиг. 20

```

                                0          1          2          3          3          4          5
                                1          1          1          abc def 0 5          5          4
kp1a (SEQ ID NO:123) DIQMTQSPST LSASVGDVRT ITCRASQSI* *****SSWLA WYQQKPKGKAP KLLIYKASSL
kp1b (SEQ ID NO:124) .....S ..... ..Q...D.. .....NY.N .....D..N.
kp1c (SEQ ID NO:125) .....S ..... ..Y...N ..... ..A...
kp1d (SEQ ID NO:126) .....S ..... ..G... ..RND.G .....R...A...
kp1e (SEQ ID NO:127) .....S ..... ..G... ..NY.. ..F..... ..S...A...
kp1f (SEQ ID NO:128) A..L.....S ..... ..G... ..A... ..D...
kp1g (SEQ ID NO:129) .....S V..... ..G... ..A... ..A...
kp2a (SEQ ID NO:130) ..V...T.LS .PVTP.EPAS .S.S...LL DSDDGNTY.D ..L...QS. Q...TL.YR
kp2b (SEQ ID NO:131) ..V...LS .PVTP.EPAS .S.S...LL HS.NGYNY.D ..L...QS. Q...LG.NR
kp2c (SEQ ID NO:132) ..V...T.LS .VTP.QPAS .S.KS...LL HS.DGKTY.Y ..L...QP. Q...EV.NR
kp3a (SEQ ID NO:133) E.V...A. .V.P.E.A. LS.....V. ....N... ..Q...R...G..TR
kp3b (SEQ ID NO:134) E.VL...G. ..L.P.E.A. LS.....VS .....Y... ..Q...R...G...R
kp3c (SEQ ID NO:135) E.VL...A. ..L.P.E.A. LS.....VS .....Y... ..Q...R...D..NR
kp4 (SEQ ID NO:136) ..V...DS .AV.L.E.A. .N.KS...VL YSSNNKNY... ..QP... ..W...TR
kp5 (SEQ ID NO:137) ETTL....AF M..TP..K.N .S.K...D... ..DDMN .....E.A IFI.QE.TT.

                                5          6          7          8          9
                                5          5 ab 3          3          3
kp1a (SEQ ID NO:123) ESGVPSRFSG SG**SGTEFT LTISSLQDD FATYQCQQYN SYS****
kp1b (SEQ ID NO:124) .T..... ..D... ..F..... ..E. I.....D NLP...
kp1c (SEQ ID NO:125) Q..... ..D... ..E..... ..E.....SY .TP...
kp1d (SEQ ID NO:126) Q..... ..D... ..E..... ..E.....L.H. .P...
kp1e (SEQ ID NO:127) Q..... ..D... ..E..... ..E..... ..P...
kp1f (SEQ ID NO:128) ..... ..D... ..E..... ..E.....F. N.P...
kp1g (SEQ ID NO:129) Q..... ..D... ..E..... ..E.....A. .FP...
kp2a (SEQ ID NO:130) A....D..... ..D... ..K..RVEAE. VGV...M.RI EFP...
kp2b (SEQ ID NO:131) A....D..... ..D... ..K..RVEAE. VGV...M.AL QTP...
kp2c (SEQ ID NO:132) F....D..... ..D... ..K..RVEAE. VGV...M.SI QLP...
kp3a (SEQ ID NO:133) AT.I.A..... ..D... ..SE... ..V.....NWP...
kp3b (SEQ ID NO:134) AT.I.D..... ..D... ..R.E.E. ..V.....G .SP...
kp3c (SEQ ID NO:135) AT.I.A..... ..D... ..E.E. ..V.....RS NWP...
kp4 (SEQ ID NO:136) ..... ..D... ..D... ..AE. V.V.....Y .TP...
kp5 (SEQ ID NO:137) VP.I.P..... ..Y...D... ..NNIESE. A.Y.F.L.HD NFP...
    
```

Фиг. 21

```

0          1          2          3          3          4          5
1          1          1          abc def 0          5          5          4
lm1a (SEQ ID NO:138) QSVLTQPPS* VSAAPGQKVT ISCSGSSSNI G***NNYVS WYQQLPGTAP KLLIYENNKR
lm1b (SEQ ID NO:139) ..... A.GT...R.. ..... S...Y ..... R..Q.
lm1c (SEQ ID NO:140) ..V..... .G....R.. ..T..... .A...GYD.H ..... G.SN.
lm2a (SEQ ID NO:141) ..A....A... .GS...SI. ..T.T..DV .S...Y.L... ..H..K... ..M...GS..
lm2b (SEQ ID NO:142) ..A....R... .GS...VI. ..T.T..DV .G...Y... ..H..K... ..M...DVS..
lm3a (SEQ ID NO:143) SY..... .V...KTAR .T.G.NNIG* *....SKS.H ....K..Q.. V.VV.DDSD.
lm3b (SEQ ID NO:144) SYE..... .VS...TAR .T...DALP* *....KQ.AY ....K..Q.. V.V..KDSE.
lm3c (SEQ ID NO:145) SYE..... .VS...TAS .T...DKLG* *....DK.AC ....K..QS. V.V...QDS..
lm4 (SEQ ID NO:146) S.E...D.A. .V.L..T.R .T.Q.D.LR* *....SY.A. ....K..Q.. V.V..GK.N.
lm6 (SEQ ID NO:147) NFM....H... .ES...KT.. ..TR..GS. A....S...Q ....R..SS. TTV...D.Q.
lm7 (SEQ ID NO:148) .T.V..E... LTVS..GT.. LT.AS.TGAV TS...GY.PN .F..K..Q.. RA...STS NK
lm8 (SEQ ID NO:149) .L....S... A..SL.AS.K LT.TL..G** *.HSSYAIA .H..Q.EKG. RY.MKL.SDG

```

```

5          6          7          8          9
5          5 ab          3          3          3
lm1a (SEQ ID NO:138) PSGIPDRFSG SK**SGTSAT LGITGLQTGD EADYYCGTWD SLSA**
lm1b (SEQ ID NO:139) ..V..... .....S .A.S..RSE. ....AA.. D...G..
lm1c (SEQ ID NO:140) ..V..... .....S .A....AE. ....QSY. ....G..
lm2a (SEQ ID NO:141) ..VSN..... .....NT.S .T.S...AE. ....CSYA G.STL..
lm2b (SEQ ID NO:142) ...V..... .....NT.S .T.S...AE. ....CSYA G.YTF..
lm3a (SEQ ID NO:143) .....E.... .N....NT.. .T.SRVEA... ..QV...SDH..
lm3b (SEQ ID NO:144) .....E.... .S....TV.. .T.S.V.AE. ....QSA. .G**..
lm3c (SEQ ID NO:145) .....E.... .N....NT.. .T.S.T.AM. ....QA...TAH..
lm4 (SEQ ID NO:146) .....S....NT.S .T...A.AE. ....NSR. .GNH..
lm6 (SEQ ID NO:147) ..V..... .IDS.SN..S .T.S..K.E. ....QSY. .N**..
lm7 (SEQ ID NO:148) H.WT.A.... .L..L.GK.A .TLS.V.PE. .E...LLYY GGAQ*..
lm8 (SEQ ID NO:149) GD..... .S....AERY .T.SS..SE. ....Q..G TGI**..

```

Фиг. 22

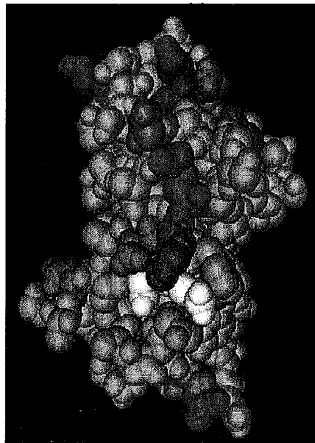
```

1          10          21          31          35
NFLLLTQPHS VSESPGKTVT ISCTRSSGSI A***NNYVH WYQORPGSSP
45          55          65AB          73          82          93
TTVIFEDDHR PSGVPDRFSG SVDTSNSAS LTISGLKTED EADYYCQSYD HNN

```

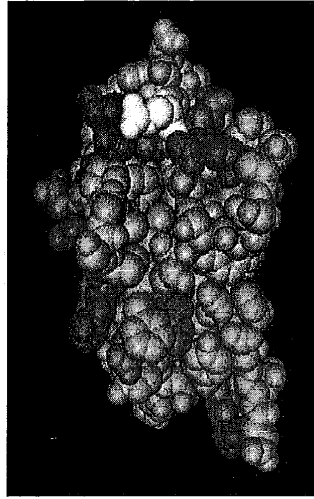
V<sub>6</sub> Wil (SEQ ID NO: 150)

Фиг. 23

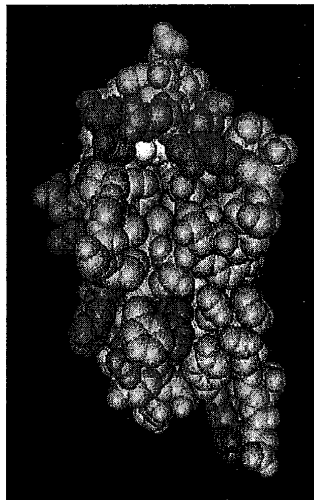


Фиг. 24



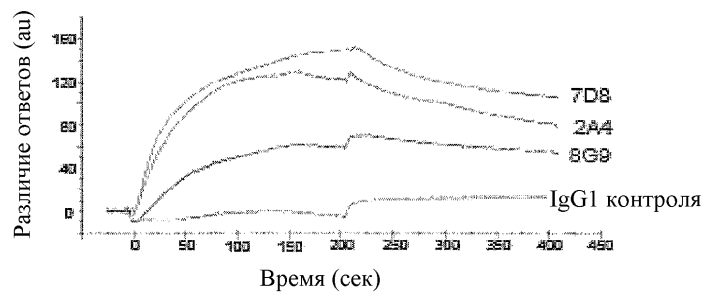


V<sub>λ</sub> Wil Glu81

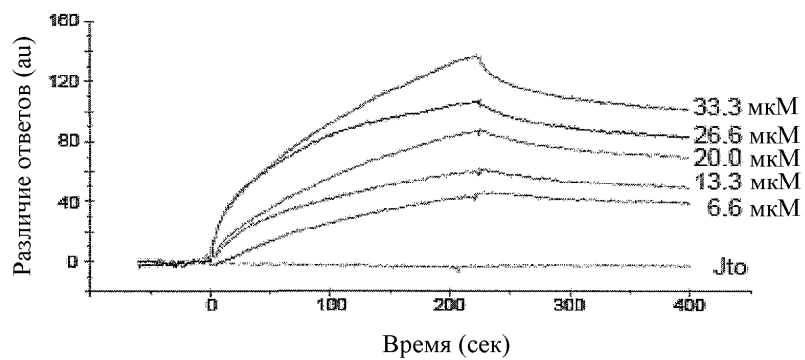


V<sub>λ</sub> Wil Asp82

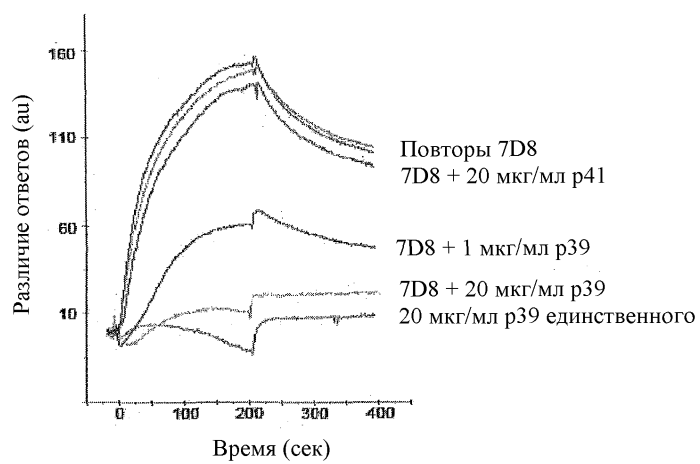
Фиг. 25



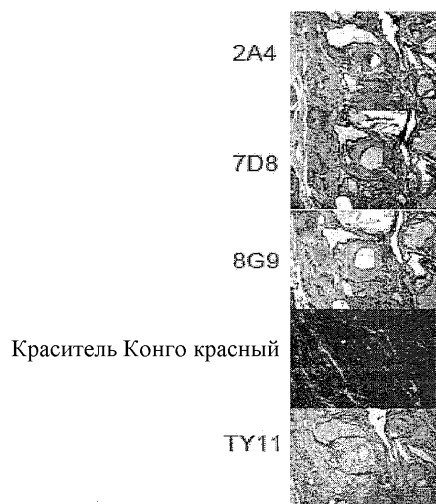
Фиг. 26



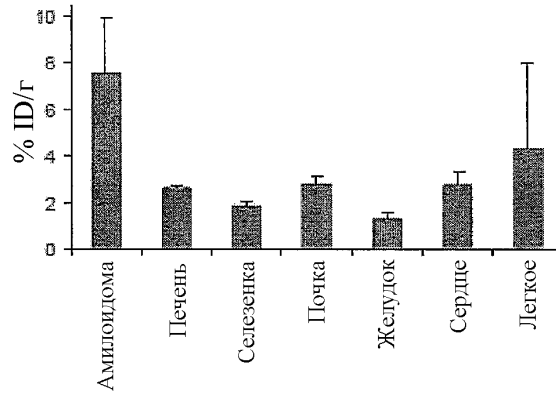
Фиг. 27



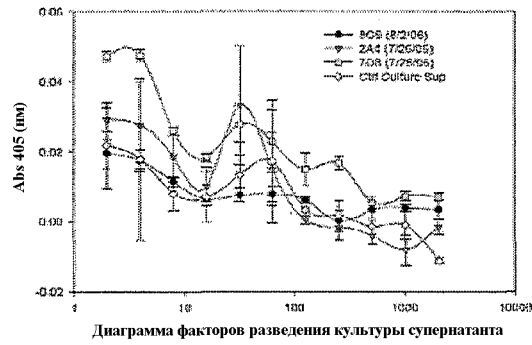
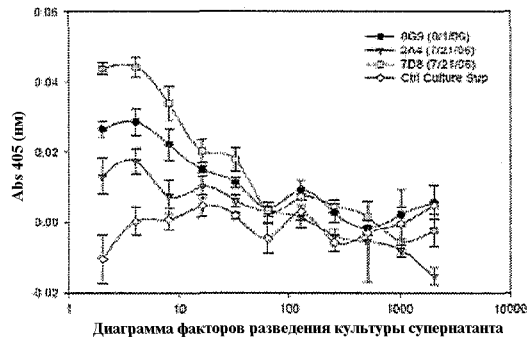
Фиг. 28



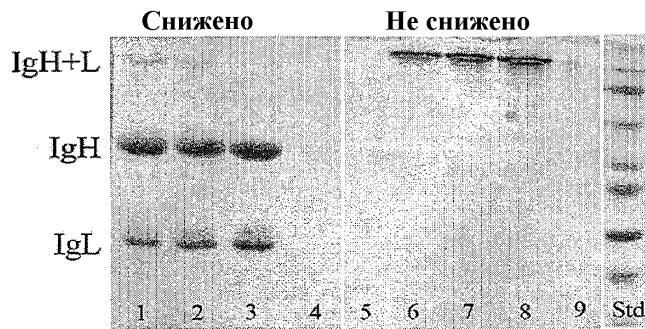
Фиг. 29



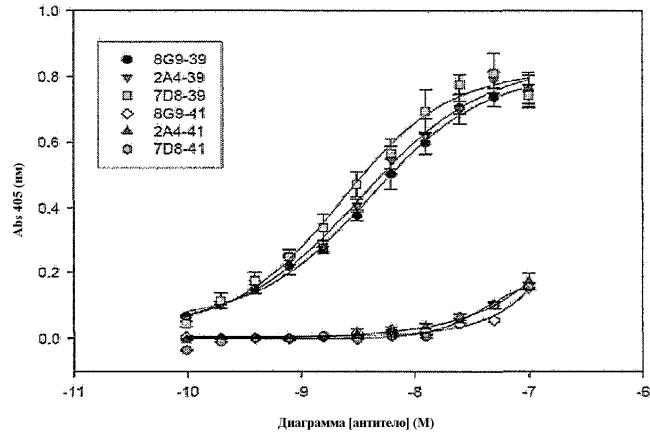
Фиг. 30



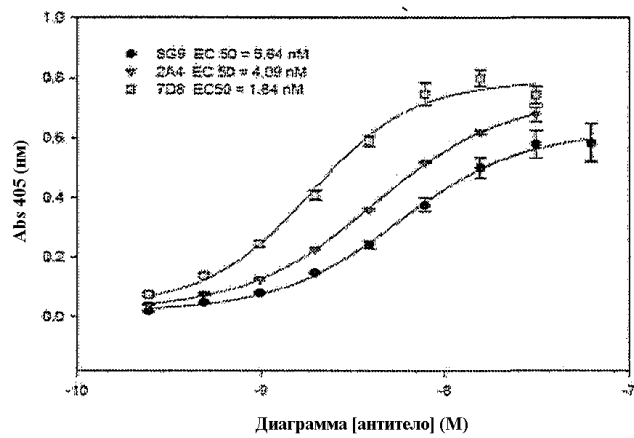
Фиг. 31



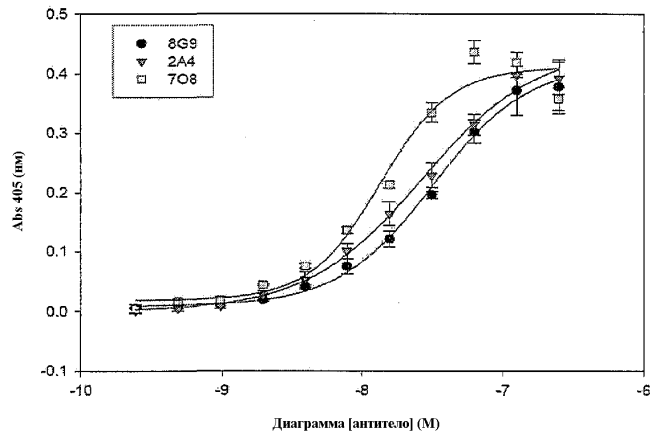
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35

Мышиный VL (2A4 и 8G9)

MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK~~VSNR~~FSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC~~SQ~~STHVPFFIFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 152)

Мышиный VL (7D8)

MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK~~VSNR~~FSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC~~SQ~~STHVPFFIFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 153)

Мышиный VH (2A4, 7D8, 8G9)

MVVLGLKWVFFVYFYQGVHCEVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTENTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSN~~NYAI~~YADSVKDRFTIFRDDSQSM~~LYLQ~~MN~~NL~~KTEDTAMYYCVRPYSD~~SEAY~~WGQGLTVT~~VSA~~ (SEQ ID NO: 154)

Фиг. 36А

Человеческий VL 24A Версия 1  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 155)

Человеческий VL 24A Версия 2  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 156)

Человеческий VL 24A Версия 3  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YYCSQSTHVPFYFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 157)

## Фиг. 36B

Человеческий VL 7D8 Версия 1  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 158)

Человеческий VL 7D8 Версия 2  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 159)

Человеческий VL 7D8 Версия 3  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YYCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 160)

Человеческий VL 7D8 Версия 4  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 174)

Человеческий VL 7D8 Версия 5  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YfCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 175)

Человеческий VL 7D8 Версия 6  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YYCSQSTHVPFYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 176)

## Фиг. 36C

Каркасный VL инвентарный No. Gen Bank BAC 01562  
 DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
 YYCMQALQTPYFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 166)

Каркасный VL инвентарный No. Gen Bank BAC 01733  
 MKYLLPTAAAAGLLLLAAQAMADVVMVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSNRASGVPDR  
 FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV  
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SARQSTPFVCEYQGQSSDLPQPPVN  
 AGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 167)

## Фиг. 36D

Человеческий VH 24A/7D8/8G9 Версия 1  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNAIYYADSVKDRFTIFRDDSKNLSLYLQMNSL  
 KTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 161)

Человеческий VH 24A/7D8/8G9 Версия 2  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNAIYYADSVKDRFTISRDDSKNLSLYLQMNSL  
 KTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 162)

Человеческий VH 24A/7D8/8G9 Версия 3  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNAIYYADSVKDRFTISRDDSKNLSLYLQMNSL  
 KTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 163)

24A 7D8 8G9 H-цепь про (мышинный VH 2A4)  
 EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNAIYYADSVKDRFTIFRDDSQSMLYLQMN  
 LKTEDTAVYYCVRPYSDSFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 164)

Каркасный VH инвентарный No. Gen Bank AAC51024  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDHYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKANSYTYEAAASVKGRFTISRDDSKNLSLYLQMN  
 SLKTEDTAVYYCARYVVGATLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 165)

## Фиг. 36E



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2