

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036080**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.23

(21) Номер заявки
201791712

(22) Дата подачи заявки
2016.01.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ТРАНСТИРЕТИНУ

(31) **62/109,002; 62/266,556**

(32) **2015.01.28; 2015.12.11**

(33) **US**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/IB2016/050415**

(87) **WO 2016/120810 2016.08.04**

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

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

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

(56) **US-A1-2014056904
WO-A2-2014124334
WO-A2-2015010118**

MONICHAN PHAY ET AL.: "Transthyretin Aggregate-Specific Antibodies Recognize Cryptic Epitopes on Patient-Derived Amyloid Fibrils", REJUVENATION RESEARCH, vol. 17, no. 2, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 97-104, XP055256411, US ISSN: 1549-1684, DOI: 10.1089/rej.2013.1524 the whole document in particular, abstract, pages 100, 101 and figure 3

GOLDSTEINS G. ET AL.: "Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 96, no. 6, 16 March 1999 (1999-03-16), pages 3108-3113, XP002987251, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.96.6.3108 the whole document in particular, abstract

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

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946 the whole document

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

B1**036080****036080****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка относится к предварительной заявке США № 62/109002, поданной 28 января 2015 г., и предварительной заявке США № 62/266556, поданной 11 декабря 2015 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка включает электронный вариант списка последовательностей в файле с именем 473373_SEQLIST.TXT, созданном 28 января 2016 г., и содержащем 135083 байта, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Уровень техники

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

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

Краткое описание сущности изобретения

Изобретение относится к антителам, которые связываются с транстиретином и содержат три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи в основном из антитела 14G8.

Некоторые антитела содержат три CDR тяжелой цепи по Кабату и три CDR легкой цепи по Кабату антитела 14G8, за исключением того, что каждая позиция H52 и L26 могут быть N или S. Некоторые антитела содержат три CDR тяжелой цепи по Кабату и три CDR легкой цепи по Кабату антитела 14G8. Не обязательно, CDR-H1 представляет собой составной CDR по Кабату-Чотия антитела 14G8. Некоторые антитела содержат три CDR тяжелой цепи по Кабату антитела 9D5. Не обязательно, CDR-H1 представляет собой составной CDR по Кабату-Чотия антитела 9D5.

Некоторые антитела связываются с тем же эпитопом на транстиретине, что и 9D5 или 14G8, и содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, причем а) каждая CDR имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности с соответствующей последовательностью CDR из переменных областей тяжелой и легкой цепей 9D5; или б) каждая CDR имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности с соответствующей последовательностью CDR из переменных областей тяжелой и легкой цепей 14G8, за исключением того, что в позиции L26 может быть N или S. Некоторые антитела содержат а) три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи 9D5; или б) три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела 14G8, за исключением того, что в позиции L26 может быть N или S. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи 9D5 представляют собой SEQ ID NO: 13-15 и 24-26 соответственно. В некоторых антителах три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела 14G8 представляют собой SEQ ID NO: 67-69 и 77-79 соответственно, за исключением того, что в позиции L26 может быть N или S.

Любое из вышеуказанных антител может быть моноклональным антителом. Любое из вышеуказанных антител может быть химерным, гуманизированным, венеризованным или человеческим антителом. Любое из вышеуказанных антител может иметь изотип IgG1 человека, изотип IgG2 человека или изотип IgG4 человека.

Изобретение дополнительно относится к гуманизированным или химерным антителам антитела мыши, которые специфически связываются с транстиретином, причем антитело мыши характеризуется переменной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 61 и переменной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 70, за исключением того, что в позиции H52 может быть S или N, в позиции H69 может быть F или I, в позиции L26 может быть S или N, а R в позиции L107 является необязательным. Не обязательно, антитела представляют собой гуманизированное или химерное антитело 9D5 или 14G8, которое специфически связывается с транстиретином, причем 9D5 представляет собой мышиное антитело, характеризующееся переменной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и переменной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 16, и 14G8 представляет собой мышиное антитело, характеризующееся переменной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 61 и переменной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 70. Не обязательно, гуманизированные антитела содержат а) переменную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи антитела 9D5, и переменную область гуманизированной зрелой легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи антитела 9D5; или б) переменную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи антитела 14G8, и переменную область гуманизированной зрелой легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи антитела 14G8, за исключением того, что в позиции L26 может быть N или S. Не обязательно,

три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела 9D5 представляют собой SEQ ID NO: 13-15 и 24-26 соответственно. Необязательно, три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела 14G8 представляют собой SEQ ID NO: 67-69 и 77-79 соответственно, за исключением того, что в положении L26 может быть N или S. Необязательно, любые различия в CDR вариабельной области зрелой тяжелой цепи и вариабельной области зрелой легкой цепи из SEQ ID NO: 1 и 16 соответственно находятся в позициях H60-H65. Необязательно, любые различия в CDR вариабельной области зрелой тяжелой цепи и вариабельной области зрелой легкой цепи из SEQ ID NO: 61 и 70 соответственно находятся в позициях H60-H65, за исключением того, что в позиции L26 может быть N или S.

Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, за исключением того, что в позиции H19 может быть R или K, в позиции H40 может быть A или T, в позиции H44 может быть G или R, в позиции H49 может быть S или A, в позиции H77 может быть S или T, в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S, а в позиции H89 может быть V или M. Необязательно по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой как указано далее: позиция H42 занята E, позиция H47 занята L, позиция H69 занята F, позиция H82 занята S, позиция H82b занята L, позиция H108 занята L, позиция L8 занята A, позиция L9 занята P, позиция L18 занята S, позиция L19 занята V, позиция L36 занята F, позиция L39 занята R, позиция L60 занята S, позиция L70 занята A, а позиция L74 занята R. Необязательно, позиции H47, H69 и H82 заняты L, F и S соответственно. Необязательно, позиции H47, H69, H82 и H82b заняты L, F, S и L соответственно. Необязательно, позиции H42, H47 и H108 заняты E, L и L соответственно. Необязательно, позиции H69, H82 и H82b заняты F, S и L соответственно. Необязательно, позиции H47 и H108 заняты L. Необязательно, позиции H82 и H82b заняты S и L соответственно. Необязательно, позиции H42, H47 и H82b заняты E, L и L соответственно. Необязательно, позиция L36 занята F. Необязательно, позиция L60 занята S. Необязательно, позиции L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 заняты A, P, V, F, R, S, A и R соответственно. Необязательно, позиции L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 заняты A, P, S, V, F, R, S, A и R соответственно.

Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, за исключением того, что в позиции H19 может быть R или K, в позиции H40 может быть A или T, в позиции H44 может быть G или R, в позиции H49 может быть S или A, в позиции H77 может быть S или T, в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S, а в позиции H89 может быть V или M. Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, за исключением того, что в позиции H19 может быть R или K, в позиции H40 может быть A или T, в позиции H44 может быть G или R, в позиции H49 может быть S или A, в позиции H77 может быть S или T, в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S и в позиции H89 может быть V или M. Необязательно, вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 5-12, и вариабельная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 19-23. В некоторых антителах вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а вариабельная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 74-76, за исключением того, что в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S, в позиции H89 может быть V или M, и в позиции L18 может быть S или P. Необязательно по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано далее: позиция H1 занята E, позиция H47 занята L, а позиция L36 занята F. Необязательно, позиции H1 и H47 заняты E и L соответственно. Необязательно, позиция L36 занята F. Необязательно по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано далее: позиция H3 занята K, позиция H105 занята T, позиция L8 занята A, позиция L9 занята P, позиция L19 занята V, позиция L26 занята S, позиция L60 занята S, а позиция L70 занята A. Необязательно, позиции H3 и H105 заняты K и T соответственно. Необязательно, позиции L8, L9, L19 и L70 заняты A, P, V и A соответственно. Необязательно, позиции L26 и L60 каждая занята S.

Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 74-76, за исключением того, что в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S, в позиции H89 может быть V или M, а в позиции L18 может быть S или P. Необязательно, гуманизированное антитело содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 74-76, за исключением того, что в позиции H82a может быть N или S, в позиции H83 может быть R или K, в позиции H84 может быть A или S, в позиции H89 может быть V или M, а в позиции L18 может быть S или P. Необязательно, вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 64-66, и вариабельная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-76. В некоторых антителах вариабельная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, а вариабельная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

Любое из вышеуказанных антител может быть интактным антителом, связывающим фрагментом, одноцепочечным антителом, фрагментом Fab или Fab'. В любом из вышеуказанных антител вариабельная область зрелой легкой цепи может быть слита с константной областью легкой цепи, а вариабельная область зрелой тяжелой цепи может быть слита с константной областью тяжелой цепи. Необязательно, константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму естественной константной области тяжелой цепи человека, которая имеет ослабленное связывание с рецептором Fcγ относительно естественной константной области тяжелой цепи человека. Необязательно, константная область тяжелой цепи является таковой изотипа IgG1. Необязательно, вариабельная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103, и/или вариабельная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим любое из вышеуказанных антител и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из вышеуказанных антител, таким как любая из SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96 и 106-108.

В изобретении дополнительно предложен рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, как описано выше, и предложена клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии.

В изобретении дополнительно предложен способ гуманизации антитела, включающий а) выбор одного или нескольких акцепторных антител; б) идентификацию аминокислотных остатков мышинового антитела, подлежащих сохранению; в) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и г) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине, чтобы продуцировать гуманизованное антитело; причем мышинное антитело представляет собой 9D5 или 14G8, при этом 9D5 характеризуется вариабельной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и вариабельной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 16, а 14G8 характеризуется вариабельной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 61 и вариабельной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 70.

В изобретении дополнительно предложен способ продуцирования гуманизованного, химерного или венированного антитела, включающий а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела, так что клетки секретируют антитело; и б) очистку антитела от клеточной культуральной среды; причем антитело представляет собой гуманизованную, химерную или венированную форму 9D5 или 14G8.

В изобретении дополнительно предложен способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизованное, химерное или венированное антитело, включающий а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи антитела и селективный маркер, в клетки; б) размножение клеток в условиях, позволяющих проводить отбор клеток, имеющих увеличенное количество копий вектора; в) выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и г) создание банка клеток, клонированных из одной клетки, выбранной на основе выхода антитела; причем антитело представляет собой гуманизованную, химерную или венированную форму 9D5 или 14G8. Необязательно, способ дополнительно включает размножение клеток в селективных условиях и отбор линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих по меньшей мере 100 мг/л/10 клеток/24 ч.

В изобретении дополнительно предложен способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретиноз или находящегося под риском

его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

В изобретении дополнительно предложен способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым ингибируя или уменьшая накопление транстиретина у субъекта.

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

В изобретении дополнительно предложен способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или находящегося под риском его развития, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой, тем самым устраняя агрегаты транстиретина у субъекта по сравнению с субъектом, имеющим транстиретинопосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела.

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

В изобретении дополнительно предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

В изобретении дополнительно предложен способ замедления начала проявления транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеуказанных антител эффективной схемой.

В изобретении дополнительно предложен способ диагностирования транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта с эффективным количеством любого из вышеуказанных антител. Необязательно, способ дополнительно включает обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем присутствие связанного антитела указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз. Необязательно, способ дополнительно включает сравнение связывания антитела с биологическим образцом со связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз. Необязательно, биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения. Необязательно, биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань. Необязательно, плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

В любом из вышеуказанных способов транстиретинопосредованный амилоидоз может необязательно быть семейным транстиретиновым амилоидозом или спорадическим транстиретиновым амилоидозом. Необязательно, семейный транстиретиновый амилоидоз является семейной амилоидной кардиомиопатией (FAC), семейной амилоидной полинейропатией (FAP) или селективным амилоидозом центральной нервной системы (CNSA). Необязательно, спорадический транстиретиновый амилоидоз является старческим системным амилоидозом (SSA) или старческим сердечным амилоидозом (SCA). В любом из вышеуказанных способов транстиретинопосредованный амилоидоз может необязательно быть связан с накоплением амилоидов в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах или желудочно-кишечном тракте субъекта.

В изобретении дополнительно предложен способ выявления присутствия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца из субъекта, подозреваемого в наличии амилоидного накопления, с эффективным количеством любого из вышеуказанных антител. Необязательно, способ дополнительно включает обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстиретина. Необязательно, способ дополнительно включает сравнение связывания антитела с биологическим образцом со связыванием антитела с контрольным образцом, при этом повышенное связывание антитела с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз. Необязательно, биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения. Необязательно, биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань. Необязательно, плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

В изобретении дополнительно предложен способ выявления количества отложений транстиретина у субъекта, включающий введение любого из антител и обнаружения присутствия связанного антитела у

субъекта. Необязательно, присутствие связанного антитела определяется позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 9D5 мыши, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 9D5. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату.

На фиг. 1В изображено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 9D5 мыши, модельного антитела мыши, акцепторного антитела человека и гуманизированных вариантов антитела 9D5. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки.

На фиг. 2А изображено выравнивание переменных областей тяжелой цепи антитела 14G8 мыши, модельного антитела мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 14G8. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату.

На фиг. 2В изображено выравнивание переменных областей легкой цепи антитела 14G8 мыши, модельного антитела мыши, акцепторных антител человека и гуманизированных вариантов антитела 14G8. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки.

Фиг. 3А и 3В: на фиг. 3А изображены кривые связывания антител 5A1, 6C1, 9D5 и 14G8 мыши с TTR, обработанным pH4; на фиг. 3В изображены кривые связывания антител 5A1, 6C1, 9D5 и 14G8 мыши с нативным TTR.

Фиг. 4А, 4В и 4С: на фиг. 4А изображено ингибирование образования фибрилл TTR-Y78F с помощью антител к mis-TTR; на фиг. 4В изображено ингибирование образования фибрилл TTR-V122I с помощью антитела 14G8; на фиг. 4С изображено ингибирование образования фибрилл TTR-V122I с помощью контрольного антитела.

Фиг. 5А и 5В: на фиг. 5А изображен анализ оптической плотности Вестерн-блот анализа образцов плазмы от пациентов, для которых подтвержден V30M ATTR (образец №№ 11, 12, 15, 18, 19, 20), и образцов от субъектов с нормальным состоянием (образец №№ 21, 22, 23, 24, 25, 27), с применением антитела 9D5 mis-TTR; на фиг. 5В изображен анализ оптической плотности Вестерн-блот анализа тех же образцов с применением антитела 5A1 mis-TTR.

На фиг. 6 изображен планшетный анализ MesoScale Discovery (MSD) образцов плазмы от пациентов с подтвержденным V30M ATTR (образец №№ 11, 12, 15, 18, 19, 20) и образцов от субъектов с нормальным состоянием (№№ 21, 22, 23, 24, 25, 27), с применением антитела 6C1.

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

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 указана как аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 9D5 мыши.

SEQ ID NO: 2 указана как аминокислотная последовательность 1SEQ_Н шаблона структуры мышиной переменной области тяжелой цепи.

SEQ ID NO: 3 указана как аминокислотная последовательность переменного акцептора тяжелой цепи ACC № BAC02114.

SEQ ID NO: 4 указана как аминокислотная последовательность переменного акцептора тяжелой цепи ACC № AAX82494.1.

SEQ ID NO: 5 указана как аминокислотная последовательность варианта 1 переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv1).

SEQ ID NO: 6 указана как аминокислотная последовательность варианта 2 переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2).

SEQ ID NO: 7 указана как аминокислотная последовательность варианта 2b переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv2b).

SEQ ID NO: 8 указана как аминокислотная последовательность варианта 3 переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3).

SEQ ID NO: 9 указана как аминокислотная последовательность варианта 3b переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv3b).

SEQ ID NO: 10 указана как аминокислотная последовательность варианта 4 переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4).

SEQ ID NO: 11 указана как аминокислотная последовательность варианта 4b переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv4b).

SEQ ID NO: 12 указана как аминокислотная последовательность варианта 5 переменной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 9D5 (Hu9D5VHv5).

SEQ ID NO: 106 указана как нуклеотидная последовательность типичной константной области тяжелой цепи аллотипа G1m3.

SEQ ID NO: 107 указана как нуклеотидная последовательность типичной константной области легкой цепи, имеющей N-концевой аргинин.

SEQ ID NO: 108 указана как нуклеотидная последовательность типичной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина.

SEQ ID NO: 109 указана как аминокислотная последовательность транстретина человека, представленную под идентификационным номером P02766.1 (UniProt).

SEQ ID NO: 110 указана как аминокислотная последовательность транстретина человека, представленная под идентификационным номером AAB35639.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 111 указана как аминокислотная последовательность транстретина человека, представленную под идентификационным номером AAB35640.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 112 указана как аминокислотная последовательность транстретина человека, представленную под идентификационным номером ABI63351.1 (GenBank).

SEQ ID NO: 113 указана как аминокислотная последовательность остатков 89-97 транстретина человека.

SEQ ID NO: 114 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 115 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 116 указана как аминокислотная последовательность потенциального транстретинового иммуногена.

SEQ ID NO: 117 указана как аминокислотная последовательность составного CDR-H1 по Чотия-Кабат антитела 9D5 мыши.

SEQ ID NO: 118 указана как аминокислотная последовательность составного CDR-H1 по Чотия-Кабат антитела 14G8 мыши.

Определения.

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

Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном означает аффинность, которая составляет по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание является более обнаруживаемым по значению и отличается от неспецифического связывания, случающегося по меньшей мере с одной посторонней мишенью. Специфическое связывание может быть результатом формирования связей между конкретными функциональными группами или конкретного пространственного соответствия (например, тип "замок и ключ"), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Однако специфическое связывание не обязательно означает, что антитело связывает одну и только одну мишень.

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

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

Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также называемая в данном до-

кументе "вариабельный домен легкой цепи" ("домен VL") или "вариабельный домен тяжелой цепи" ("домен VH" соответственно) состоит из "каркасной" области, прерывающейся тремя "областями, определяющими комплементарность" или "CDR". Каркасные области используют для выравнивания CDR по специфическому связыванию с эпитопом антигена. CDR содержат аминокислотные остатки антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От аминоконца до карбоксиконца как домены VL, так и VH содержат следующие каркасные (FR - framework) и CDR области: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR 1, 2 и 3 домена VL также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3.

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

Таблица 1
Общепринятые определения CDR с использованием нумерации Kabat

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

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

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Dabs, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть продуцированы с помощью способов рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает биспецифическое антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифических антителах две различные пары тяжелых/легких цепей включают пару тяжелая цепь/легкая цепь гуманизированного 9D5 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на трансиретине, чем тот, что связан антителом 9D5. В некоторых биспецифических антителах две различ-

ные пары тяжелых/легких цепей включают пару тяжелая цепь/легкая цепь гуманизированного 14G8 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстирине, чем тот, что связан антителом 14G8.

В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизированное антитело 9D5 или 14G8, как дополнительно описано ниже, а другая пара тяжелая цепь/легкая цепь из антитела, которое связывается с рецептором, экспрессируемым на гематоэнцефалическом барьере, таким как рецептор инсулина, рецептор инсулинподобного фактора (IGF - insulin-like growth factor), рецептор лептина или рецептор липопротеинов или рецептор трансферрина (Friden et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Такое биспецифическое антитело может быть перенесено через гематоэнцефалический барьер посредством рецепторопосредованного трансцитоза. Поглощение мозгом биспецифического антитела может быть дополнительно усилено путем проектирования биспецифического антитела для снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводит к более широкому распространению в мозге (см., например, Atwal et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

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

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть сформирован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сближающихся посредством третичного свертывания одного или нескольких белков. Эпитопы, сформированные из смежных аминокислот (также известные как линейные эпитопы), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, сформированные путем третичного свертывания (также известные как конформационные эпитопы), обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, а более обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс (смотрите, например, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)). Эпитоп может быть линейным, таким как эпитоп, например, 2-5, 3-5, 3-9 или 5-9 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 109. Эпитоп также может быть конформационным эпитопом, содержащим, например, два или более несмежных сегмента аминокислот в пределах остатков 89-97 SEQ ID NO: 109.

Если говорят, что антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот 89-97 транстирина (TTR), например, то подразумевается, что эпитоп находится в пределах описанного промежутка аминокислот, включая те, которые определяют внешние пределы промежутка. Это не обязательно означает, что каждая аминокислота в пределах промежутка составляет часть эпитопа. Так, например, эпитоп в пределах аминокислот 89-97 TTR может состоять из аминокислот 89-97, 89-96, 90-96, 91-96, 92-96, 93-96, 94-96, 89-96, 89-95, 89-94, 89-93, 89-92 или 89-93 среди других линейных сегментов SEQ ID NO: 113, или в случае конформационных эпитопов, несмежных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 113.

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

Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al.,

Cancer Res. 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например по меньшей мере 2×, 5×, 10×, 20× или 100×) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, как измерено при анализе конкурентного связывания. Некоторые тестируемые антитела ингибируют связывание эталонных антител по меньшей мере на 75, 90 или 99%. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, находящимся достаточно проксимально по отношению к эпитопу, связанному эталонным антителом для создания стерического препятствия.

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

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

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель, разбавитель, эксципиент или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами состава и не являются, по существу, вредными для его реципиента.

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

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

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

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

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

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

Для классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи):

asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены подразумевают замены между аминокислотами в одном классе. Неконсервативные замены заключаются в обмене члена одного из этих классов на член другого.

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

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

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

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

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

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

Подробное описание сущности изобретения

I. Общие положения.

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

II. Молекулы-мишени.

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

Установленная функция TTR в крови заключается в транспорте холо-ретинолсвязывающего белка. Хотя TTR является основным переносчиком тироксина (T_4) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам, используемым для холо-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания T_4 фактически незаняты у людей.

TTR является одним по меньшей мере из 13 различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразии агрегатных структур, как полагают, вызывает дегенеративные заболевания, называемые амилоидными заболеваниями. TTR должен претерпеть конформационные изменения, чтобы стать амилоидогенным. Частичное разворачивание раскрывает участки почти незаряженных гидрофобных остатков в развернутой конформации, которые эффективно неправильно собираются в почти полностью неструктурированные сферические агрегаты, которые в конечном итоге претерпевают конформационное преобразование в амилоидные структуры с бета-листами.

Если иное не очевидно из контекста, отсылка к транстиретину (TTR) или его фрагментам или доменам включает природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутантные и аллельные варианты. Иллюстративные полипептидные последовательности TTR обозначаются идентификационными номерами P02766.1 (UniProt), AAB35639.1 (GenBank), AAB35640.1 (GenBank) и ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NOS: 109-112 соответственно). Остатки нумеруются в соответствии с P02766.1 Swiss Prot, с первой аминокислотой зрелого белка (то есть не включая 20-аминокислотную сигнальную последовательность), обозначенной остатком 1. В любом другом белке TTR остатки нумеруются согласно соответствующим остаткам в P02766.1 при максимальном выравнивании.

III. Транстиретиновый амилоидоз.

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

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

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

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

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

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

Диагностика TTR амилоидоза обычно основывается на биопсии органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя конго красной. Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание для TTR, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является TTR. Для наследственных форм заболеваний

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

IV. Антитела.

А. Специфичность связывания и функциональные свойства.

В изобретении предложены моноклональные антитела, связывающиеся с белком транстиретином (TTR), более конкретно с эпитопами в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 113) белка TTR. Такие эпитопы являются скрытыми в нативном тетрамере TTR и экспонированы в мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фебрильных формах TTR.

Антитела, обозначенные как 9D5 и 14G8, представляют собой два таких иллюстративных антитела мыши. Если не очевидно из контекста, отсылку к 9D5 или 14G8 следует понимать, как относящуюся к любой из мышиных, химерных, венированных и гуманизированных форм этих антител. Эти антитела специфически связываются в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 113) белка TTR. Эти антитела дополнительно характеризуются их способностью связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами TTR, но не с нативными тетрамерными формами TTR. Кроме того, эти антитела характеризуются иммунореактивностью к сердечной ткани, подверженной TTR-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой сердечной ткани. Способность связываться с конкретными белками или их фрагментами может быть продемонстрирована с использованием иллюстративных форматов анализа, представленных в примерах.

Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитела, обозначенные как 9D5 или 14G8. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей этих антител обозначены как SEQ ID NO: 1 и 16 (9D5) и 61 и 70 (14G8) соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей с помощью TTR или его части, включая желаемый эпитоп (например, SEQ ID NO: 113), и путем скрининга полученных антител на связывания с мономерным TTR или пептидом, содержащим SEQ ID NO: 113, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим переменные области антитела мыши 9D5 или 14G8 (IgG1 каппа). Фрагменты TTR, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызывать гуморальный ответ на фрагмент, и/или смешаны с адъювантом, который помогает вызвать такой ответ. Такие антитела могут быть проверены на различие в связывании с мономерным вариантом TTR, вариантом дикого типа или фрагментом TTR (например, SEQ ID NO: 113) по сравнению с мутантами по указанным остаткам. Скрининг при сравнении с такими мутантами более точно определяет специфичность связывания, что позволяет идентифицировать антитела, связывание которых ингибируется мутагенезом определенных остатков и которые, вероятно, будут обладать функциональными свойствами других иллюстративных антител. Мутации могут быть систематической заменой аланином (или серином, если уже присутствует аланин), по одному остатку за раз, или заменой более широкими интервалами по всей мишени или по всему ее участку, в котором, как известно, находится эпитоп. Если один и тот же набор мутаций значительно снижает связывание двух антител, оба антитела связывают один и тот же эпитоп.

Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 9D5 или 14G8), также могут быть получены с использованием варианта способа фагового дисплея (см. Winter, WO 92/20791). Этот способ особенно подходит для продуцирования человеческих антител. В этом способе в качестве исходного материала используют переменную область или тяжелой, или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве исходного материала выбрана переменная область легкой цепи, то создают библиотеку фагов, в которой элементы отображают одну и ту же переменную область легкой цепи (то есть исходный материал мыши) и другую переменную область тяжелой цепи. Переменные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки перегруппированных переменных областей тяжелой цепи человека. Отбирается фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание (например, по меньшей мере 10^8 , а предпочтительно по меньшей мере 10^9 M⁻¹) для мономера TTR или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97). Переменная область тяжелой цепи из этого фага затем служит в качестве исходного материала для конструирования дополнительной библиотеки фагов. В этой библиотеке каждый фаг отображает ту же самую переменную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплей-библиотеки) и другую переменную область легкой цепи. Переменные области легкой цепи могут быть получены, например, из библиотеки перегруппированных переменных областей легкой цепи человека. Опять же, выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание для мономерного TTR или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97). Полученные антитела обычно имеют такую же или сходную специфичность к эпитопу, что и исходный материал мыши. CDR по Кабату тяжелой цепи 9D5 обозначены SEQ ID NO: 13-15 соответственно, а CDR по Кабату легкой цепи 9D5 обозначены SEQ ID NO: 24-26 соответственно. Составной CDR-H1 по Чотия-Кабат антитела 9D5 обозначен как SEQ ID NO: 117. CDR по Кабату тяжелой цепи 14G8 обозначены SEQ ID NO: 67-69 соответ-

ственно, а CDR по Кабату легкой цепи 14G8 обозначены SEQ ID NO: 77-79 соответственно. Составной CDR-H1 по Чотия- Кабат антитела 14G8 обозначен как SEQ ID NO:118. Вариант CDR-L1 антитела 14G8 обозначен как SEQ ID NO: 80.

Другие антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 9D5 или 14G8. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны антителу 9D5 или 14G8 по аминокислотной последовательности переменных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепей, и сохраняют его функциональные свойства и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну или все шесть CDR, как определено в соответствии с любым общепринятым соглашением, но предпочтительно по Кабату у, которые являются на 90, 95, 99 или 100% идентичными соответствующим CDR антитела 9D5 или 14G8.

В изобретении также предложены антитела, имеющие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR полностью или практически полностью из 9D5 или 14G8. Такие антитела могут содержать переменную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из переменной области тяжелой цепи антитела 9D5 или 14G8, и/или переменную область легкой цепи, имеющая по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или почти полностью из переменной области легкой цепи антитела 9D5 или 14G8. Антитела могут также включать как тяжелые, так и легкие цепи. CDR является почти полностью взят из соответствующего CDR антитела 9D5 или 14G8, когда он содержит не более 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций, за исключением того, что CDR-H2 (когда определено по Кабату) может иметь не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен, вставки или удаления. Такие антитела могут иметь по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с антителом 9D5 или 14G8 по аминокислотной последовательности переменных зрелой тяжелой и/или легкой цепи(-ей) и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от антитела 9D5 или 14G8 небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок.

Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами TTR, но не с нативными тетрамерными формами TTR, как описано в примерах или где-либо еще. Аналогично, некоторые антитела являются иммунореактивными к ткани, подверженной TTR-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой ткани.

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

В. Нечеловеческие антитела.

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

С. Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически модифицированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого "донорного" антитела переносят в последовательности "акцепторного" антитела человека (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205 и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, составную последовательность из таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность из клеток зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR полностью или почти полностью из донорных антител, каркасные последовательности вариательной области и константные области, если они присутствуют, полностью или почти полностью из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или почти полностью из тяжелой цепи донорного антитела, каркасную последовательность вариательной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса вариательной области тяжелой цепи и последовательностей константной области человека. Схожим образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или почти полностью из легкой цепи донорного антитела, каркасную последовательность вариательной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если она присутствует, почти полностью из каркаса вариательной области легкой цепи и последовательностей константной области человека. Помимо нанотел и dAbs, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе является почти полностью из соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (как определено согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определено по Кабату) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности вариательной области цепи антитела или константной области цепи антитела являются почти полностью из каркасной последовательности вариательной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, определенных согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определенные по Кабату, являются идентичными.

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

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

Последовательности акцепторного антитела человека могут быть необязательно выбраны из многих известных последовательностей антител человека для того, чтобы обеспечить высокую степень идентичности последовательности (например, идентичность 65-85%) между каркасами вариательной области последовательности акцептора человека и соответствующими каркасами вариательной области цепи донорного антитела.

Примерами последовательностей акцептора для тяжелой цепи являются вариательные области зрелой тяжелой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - BAC02114 и AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 3 и 4) и вариательные области тяжелой цепи человека подгруппы 3 по Кабату. BAC02114 разделяет ту же традиционную форму, что и тяжелая цепь 9D5 мыши. Другими примерами последовательностей акцептора для тяжелой цепи являются вариательные области зрелой тяжелой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 63 и 4) и вариательные области тяжелой цепи человека подгруппы 1 по Кабату. AAD30410.1 и AAX82494.1 включают два CDR, имею-

щих ту же традиционную форму, что и тяжелая цепь 14G8 мыши. Примерами последовательностей акцептора для легкой цепи являются переменная область зрелой легкой цепи человека с идентификационным номером NCBI - ABC66952 (SEQ ID NO: 18) и переменные области легкой цепи человека подгруппы 3 по Кабату. ABC66952 включает два CDR, имеющих ту же традиционную форму, что и легкая цепь 9D5 мыши. Другими примерами последовательностей акцептора для легкой цепи являются переменные области зрелой легкой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NOS: 72 и 73 соответственно) и переменные области легкой цепи человека подгруппы 2 по Кабату. ABA71374.1 и ABC66952.1 имеют ту же традиционную форму, что и легкая цепь 14G8 мыши.

Если выбрано более одной последовательности акцепторного антитела человека, может быть использован композит или гибрид этих акцепторов, и аминокислоты, используемые в разных позициях в переменных областях гуманизированной легкой цепи и гуманизированной тяжелой цепи, могут быть взяты из любых используемых последовательностей акцепторного антитела человека. Например, переменные области зрелой тяжелой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - BAC02114 и AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 3 и 4) использовались в качестве последовательностей акцептора для гуманизации переменной области зрелой тяжелой цепи 9D5. Примеры позиций, в которых эти два акцептора различаются, включают позиции H19 (R или K), H40 (A или T), H44 (G или R), H49 (S или A), H77 (S или T), H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M). Гуманизированные варианты переменной области тяжелой цепи 9D5 могут содержать одну из двух таких аминокислот в любой из этих позиций. Аналогично, переменные области зрелой тяжелой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 63 и 4 соответственно) использовали в качестве последовательностей акцептора для гуманизации переменной области зрелой тяжелой цепи 14G8. Примеры позиций, в которых эти два акцептора различаются, включают позиции H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M). Гуманизированные варианты переменной области тяжелой цепи 14G8 могут содержать одну из двух таких аминокислот в любой из этих позиций. Аналогично, переменные области зрелой легкой цепи человека с идентификационными номерами NCBI - ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NOS: 72 и 73 соответственно) использовали в качестве последовательностей акцептора для гуманизации переменной области зрелой легкой цепи 14G8. Примером позиции, в которой эти два акцептора отличаются, является позиция L18 (S или P). Гуманизированные варианты переменной области легкой цепи 14G8 могут содержать одну из двух таких аминокислот в этой позиции.

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

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

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

Аминокислотные остатки каркаса из классов 1) - 3), как определено Queen, US 5530101, иногда поочередно упоминаются как канонические и верниальные (vernier) остатки. Аминокислотные остатки каркаса, которые помогают определить конформацию петли CDR, иногда упоминаются как канонические остатки (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996)). Аминокислотные остатки каркаса, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют определенную роль в тонкой подгонке антитела к антигену, иногда упоминаются как верниальные остатки (vernier residues) (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

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

Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы мышиных антител 9D5 или 14G8, обозначенных соответственно Hu9D5 или Hu14G8. Антитело 9D5 мыши содержит переменные области зрелой тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последова-

тельности, включающие SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 16 соответственно. В изобретении предложены восемь иллюстративных переменных областей гуманизированной зрелой тяжелой цепи: Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b и Hu9D5VHv5 (SEQ ID NOS: 5-12 соответственно). В изобретении дополнительно предложены пять иллюстративных переменных областей зрелой легкой цепи человека: Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4 и Hu9D5VLv5 (SEQ ID NOS: 19-23 соответственно). Фиг. 1 иллюстрирует выравнивания 9D5, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и различных гуманизированных антител.

Антитело 14G8 мыши содержит переменные области тяжелой и легкой зрелых цепей, имеющие аминокислотные последовательности, включающие SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 70 соответственно. В изобретении предложены три иллюстративных переменных области гуманизированной зрелой тяжелой цепи: Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2 и Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64-66 соответственно). В изобретении дополнительно предложены три иллюстративных переменных области зрелой легкой цепи человека: Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2 и Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 74-76 соответственно). Фиг. 2 иллюстрирует выравнивания 14G8, модельных антител мыши, акцепторных антител человека и различных гуманизированных антител.

По причинам, таким как возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредованное взаимодействия между тяжелыми и легкими цепями, взаимодействие с константной областью, является сайтом для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, является необычным остатком для своей позиции в последовательности переменной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию и другим причинам, следующие 15 позиций в каркасе переменной области были рассмотрены как кандидаты на замещения в восьми иллюстративных переменных областях зрелой тяжелой цепи Hu9D5 и в пяти иллюстративных переменных областях зрелой легкой цепи Hu9D5, как указано далее в примерах H42 (G42E), H47 (W47L), H69 (I69F), H82 (M82S), H82b (S82(b)L), H108 (T108L), L8 (P8A), L9 (L9P), L18 (P18S), L19 (A19V), L36 (Y36F), L39 (K39R), L60 (D60S), L70 (D70A) и L74 (K74R). Аналогичным образом, следующие 11 позиций каркаса переменной области рассматривались как кандидаты на замену в трех иллюстративных переменных областях зрелой тяжелой цепи Hu14G8 и трех иллюстративных переменных областях зрелой легкой цепи Hu14G8, как дополнительно указано в примерах H1 (Q1E), H3 (Q3K), H47 (W47L), H105 (Q105T), L8 (P8A), L9 (L9P), L19 (A19V), L26 (N26S), L36 (Y36F), L60 (D60S) и L70 (D70A).

Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, образованного путем вставки CDR по Кабату или составного CDR по Чотия-Кабату в случае CDR-H1, в каркас акцептора человека (например, составной или гибридный каркас акцептора человека), а второй упомянутый остаток представляет собой остаток, который рассматривается как заменяющий такой остаток. Таким образом, в пределах каркасов переменной области первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR первый упомянутый остаток является мышинным.

Иллюстративные антитела Hu9D5 включают любые перестановки или комбинации иллюстративных переменных областей тяжелой и легкой зрелых цепей (например, VHv1/VLv1 или H1L1, VHv1/VLv2 или H1L2, VHv1/VLv3 или H1L3, VHv1/VLv4 или H1L4, VHv1/VLv5 или H1L5, VHv2/VLv1 или H2L1, VHv2/VLv2 или H2L2, VHv2/VLv3 или H2L3, VHv2/VLv4 или H2L4, VHv2/VLv5 или H2L5, VHv2b/VLv1 или H2bL1, VHv2b/VLv2 или H2bL2, VHv2b/VLv3 или H2bL3, VHv2b/VLv4 или H2bL4, VHv2b/VLv5 или H2bL5, VHv3/VLv1 или H3L1, VHv3/VLv2 или H3L2, VHv3/VLv3 или H3L3, VHv3/VLv4 или H3L4, VHv3/VLv5 или H3L5, VHv3b/VLv1 или H3bL1, VHv3b/VLv2 или H3bL2, VHv3b/VLv3 или H3bL3, VHv3b/VLv4 или H3bL4, VHv3b/VLv5 или H3bL5, VHv4/VLv1 или H4L1, VHv4/VLv2 или H4L2, VHv4/VLv3 или H4L3, VHv4/VLv4 или H4L4, VHv4/VLv5 или H4L5, VHv4b/VLv1 или H4bL1, VHv4b/VLv2 или H4bL2, VHv4b/VLv3 или H4bL3, VHv4b/VLv4 или H4bL4, VHv4b/VLv5 или H4bL5, VHv5/VLv1 или H5L1, VHv5/VLv2 или H5L2, VHv5/VLv3 или H5L3, VHv5/VLv4 или H5L4 и VHv5/VLv5 или H5L5).

В изобретении предложены варианты гуманизированных антител 9D5, в которых переменная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с гуманизированной Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11) и переменная область гуманизированной зрелой легкой цепи показывает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19). В некоторых таких антителах сохраняются по меньшей мере 1, 2 или все 3 обратных мутаций или других мутаций в Hu9D5 H4bL1. В изобретении также предложены варианты других иллюстративных гуманизированных антител 9D5. Такие варианты имеют переменные области легкой и тяжелой зрелых цепей, показывающие по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательностей с переменными областями легкой и тяжелой зрелых цепей иллюстративных гуманизированных антител 9D5 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H1L5, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H2L5, H2bL1, H2bL2, H2bL3, H2bL4, H2bL5, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H3L5, H3bL1, H3bL2, H3bL3, H3bL4, H3bL5, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H4L5, H4bL1, H4bL2, H4bL3, H4bL4, H4bL5, H5L1, H5L2, H5L3, H5L4 или H5L5.

В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H42, H47, H69, H82, H82b и H108 в об-

ласти Vh занята E, L, F, S, L и L соответственно. В некоторых антителах позиции H47, H69 и H82 в области Vh заняты соответственно L, F и S, как в Hu9D5VHv1. В некоторых антителах позиции H47, H69, H82 и H82b в области Vh заняты соответственно L, F, S и L, как в Hu9D5VHv2. В некоторых антителах позиции H42, H47 и H108 в области Vh заняты E, L и L соответственно, как в Hu9D5VHv2b. В некоторых антителах позиции H69, H82, и H82b в области Vh заняты соответственно F, S и L, как в Hu9D5VHv3. В некоторых антителах позиции H47 и H108 в области Vh каждая занята L, как в Hu9D5VHv3b и Hu9D5VHv4b. В некоторых антителах позиции H82, и H82b в области Vh заняты соответственно S и L, как в Hu9D5VHv4. В некоторых антителах позиции H42, H47 и H82b в области Vh заняты E, L и L соответственно, как в Hu9D5VHv5. В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 в области Vk занята A, P, S, V, F, R, S, A и R соответственно. В некоторых антителах позиция L36 в области Vk занята F, как в Hu9D5VLv1. В некоторых антителах позиция L60 в области Vk занята S, как в Hu9D5VLv3. В некоторых антителах позиции L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 в области Vk заняты A, P, V, F, R, S, A и R соответственно, как в Hu9D5VLv4. В некоторых антителах позиции L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 в области Vk заняты A, P, S, V, F, R, S, A и R соответственно, как в Hu9D5VLv5. Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или почти полностью идентичными областям CDR мышиногo донорного антитела 9D5 или любого из вышеуказанных гуманизированных антител 9D5. Области CDR могут быть определены согласно любому общепринятому соглашению (например, по Чотия или составное по Чотия и Кабату), но предпочтительно, как определено по Кабату.

Каркасные позиции переменных областей соответствуют нумерации Kabat, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu9D5 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций. Такие отличия обычно приходятся на каркас, но могут также встречаться в CDR.

Иллюстративные антитела Hu14G8 включают любые перестановки или комбинации иллюстративных переменных областей тяжелой и легкой зрелых цепей (например, VHv1/VLv1 или H1L1, VHv1/VLv2 или H1L2, VHv1/VLv3 или H1L3, VHv2/VLv1 или H2L1, VHv2/VLv2 или H2L2, VHv2/VLv3 или H2L3, VHv3/VLv1 или H3L1, VHv3/VLv2 или H3L2 и VHv3/VLv3 или H3L3).

В изобретении предложены варианты гуманизированных антител 14G8, в которых переменная область гуманизированной зрелой тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с Hu14G8VHv2 (Hu14G8 H2) (SEQ ID NO: 65), и переменная область гуманизированной зрелой легкой цепи показывает по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с Hu14G8VLv3 (Hu14G8 L3) (SEQ ID NO: 76). В некоторых таких антителах сохраняются по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или все 5 обратных мутаций или других мутаций в Hu14G8 H2L3. В изобретении также предложены варианты других иллюстративных гуманизированных антител 14G8. Такие варианты имеют переменные области легкой и тяжелой зрелых цепей, показывающие по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательностей с переменными областями легкой и тяжелой зрелых цепей иллюстративных гуманизированных антител 14G8 H1L1, H1L2, H1L3, H2L1, H2L2, H2L3, H3L1, H3L2 или H3L3.

В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H1 и H47 в области Vh занята E и L соответственно. В некоторых антителах позиции H1 и H47 в области Vh заняты E и L соответственно, как в Hu14G8VHv2 и Hu14G8VHv3. В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций H3 и H105 в области Vh занята соответственно K и T. В некоторых антителах позиции H3 и H105 в области Vh заняты соответственно K и T, как в Hu14G8VHv1. В некоторых антителах позиция L36 в области Vk занята F, как в Hu14G8VLv2. В некоторых антителах по меньшей мере одна из позиций L8, L9, L19, L26, L60 и L70 в области Vk занята соответственно A, P, V, S, S и A. В некоторых антителах позиции L8, L9, L19 и L70 в области Vk заняты соответственно A, P, V и A, как в Hu14G8VLv1. В некоторых антителах позиции L26 и L60 в области Vk заняты S, как в Hu14G8VLv3. Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или почти полностью идентичными областям CDR мышиногo донорного антитела 14G8. Области CDR могут быть определены согласно любому общепринятому соглашению (например, по Чотия или составное по Чотия и Кабату), но предпочтительно, как определено по Кабату.

Каркасные позиции переменных областей соответствуют нумерации Kabat, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей Hu14G8 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций. Такие отличия обычно приходятся на каркас, но могут также встречаться в CDR.

Возможностью для дополнительных вариаций в гуманизированных вариантах 9D5 или 14G8 являются дополнительные обратные мутации в каркасах переменной области. Многие из остатков каркаса, не контактирующих с CDR в гуманизированном mAb, могут вмещать замены аминокислот из соответствующих позиций донорного mAb мыши или других антител мыши или человека, и даже многие потенциальные контактные остатки в CDR также поддаются замене. Даже аминокислоты в CDR могут быть изменены, например, на остатки, обнаруженные в соответствующей позиции последовательности акцептора человека, используемой для предоставления каркасов переменной области. Кроме того, альтернативные последовательности акцептора человека могут быть использованы, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяются различные акцепторные последовательности, одна или несколько реко-

мендованных выше обратных мутаций могут не выполняться, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратных мутаций.

Предпочтительно замены или обратные мутации в гуманизированных вариантах 9D5 или 14G8 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного mAb, то есть его способность связываться с мономерным TTR (например, активность в некоторых или всех анализах, описанных в настоящих примерах, варианта гуманизированного антитела 9D5 или 14G8, является, по существу, такой же, то есть в пределах экспериментальной погрешности, как и у антитела 9D5 или 14G8 мыши).

D. Химерные и венированные антитела.

В изобретении дополнительно предложены химерные и венированные формы нечеловеческих антител, в частности антитела примеров 9D5 или 14G8.

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

Венированное антитело является типом гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и, как правило, все CDR, и некоторые остатки каркаса нечеловеческой переменной области нечеловеческого антитела, но в котором заменяют другие каркасные остатки переменной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например, экспонированные остатки (Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489, 1991) на остатки из соответствующих позиций последовательности человеческого антитела. Результатом является антитело, в котором CDR взяты полностью или почти полностью из нечеловеческого антитела, и каркасы переменной области нечеловеческого антитела делают более подобными таковым человека с помощью замен. Венированные формы антител 9D5 или 14G8 включены в изобретение.

E. Антитела человека.

Человеческие антитела к мономерному TTR или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 89-97 (SEQ ID NO: 113) белка TTR) производят с помощью различных методов, описанных ниже. Некоторые антитела человека выбирают с помощью экспериментов по конкурентному связыванию, с помощью способа Винтера - фагового дисплея, описанного выше, или иным образом, что получить антитело с такой специфичностью к эпитопу, как и в конкретном антителе мыши, таком как одно из моноклональных антител мыши, описанные в примерах. Также для человеческих антител может быть проведен скрининг на специфичность к определенному эпитопу, используя только фрагмент TTR, такой как вариант TTR, содержащий только аминокислотные остатки 89-97 TTR, в качестве целевого антигена, и/или скрининг антител против набора вариантов TTR, таких как варианты TTR, содержащие различные мутации в аминокислотных остатках 89-97 TTR.

Способы получения человеческих антител включают способы триомы Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664 и Engleman et al., патент США № 4634666, использование трансгенной мыши, содержащей гены иммуноглобулинов человека (см., например, Lonberg et al., *WO* 93/12227 (1993); *US* 5877397; *US* 5874299; *US* 5814318; *US* 5789650; *US* 5770429; *US* 5661016; *US* 5633425; *US* 5625126; *US* 5569825; *US* 5545806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996) и Kuchlerlapati, *WO* 91/10741 (1991)) и способы фагового дисплея (см., e.g., Dower et al., *WO* 91/17271; McCafferty et al., *WO* 92/01047; *US* 5877218; *US* 5871907; *US* 5858657; *US* 5837242; *US* 5733743 и *US* 5565332).

F. Выбор константной области.

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

Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепей, такая как С-концевой лизин тяжелой цепи, может отсутствовать или может образовать производное в пропорции, или быть во всех молекулах. Замены могут быть сконструированы в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как комплементопосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, Winter et al., патент США № 5624821, Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), или для увеличения периода полувыведения у человека (см., e.g., Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Типичные замены включают Gln в позиции 250 и/или Leu в позиции 428 (нумерация ЕС используется в этом параграфе для константной области) для увеличения периода полувыведения антитела. Замены в любой или во всех позициях 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают родство к рецепторам Fcγ, в частности рецептору FcγRI (см., например, *US* 6624821).

Может быть использована аланиновая замена в позициях 234, 235 и 237 человеческого IgG1 для снижения эффекторных функций. Некоторые антитела имеют замены на аланин в позициях 234, 235 и 237 IgG1 человека для снижения эффекторных функций. Необязательно, аминокислоты в позициях 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека заменены на аланин, а в позиции 235 - на глутамин (см., например, US 5624821). В некоторых антителах используется мутация в одной или нескольких позициях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по нумерации ЕС IgG1 человека. В некоторых антителах используется мутация в одной или нескольких позициях 318, 320 и 322 по нумерации ЕС IgG1 человека. В некоторых антителах в позициях 234 и/или 235 аминокислота замещена аланином и/или в позиции 329 замещена глицином. В некоторых антителах в позициях 234 и 235 аминокислоты замещены на аланины, например, в SEQ ID NO: 102. В некоторых антителах изотипом является IgG2 или IgG4 человека.

Иллюстративная константная область каппа-легкой цепи человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. N-концевой аргинин SEQ ID NO: 104 может быть опущен, и в этом случае константная область каппа-легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. Иллюстративная константная область тяжелой цепи IgG1 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101 (с или без C-концевого лизина). Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

Константные области антитела человека показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидами, то есть константные области могут различаться у разных людей в одной или больше полиморфных позициях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или нескольких других изотипов. Так, например, другая константная область тяжелой цепи относится к аллотипу G1m3 IgG1 и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103. Другая константная область тяжелой цепи аллотипа G1m3 IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 (с или без C-концевого лизина). Отсылка к константной области антитела человека включает константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих позиции в природных аллотипах.

G. Экспрессия рекомбинантных антител.

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

Аналогичным образом можно клонировать вариабельную область VL легкой цепи. В одном подходе набор консенсусных праймеров предназначен для амплификации областей VL, используя 5'-праймер, предназначенный для гибридизации с областью VL, включающей кодон инициации трансляции, и 3'-праймер, специфический к области C_κ ниже от V-J объединяющей области. Во втором подходе используется 5'-RACE RT-PCR методика для клонирования кодирующей кДНК VL. Иллюстративные праймеры описаны в Шенк, см. выше. Затем клонированные последовательности объединяют с последовательностями, кодирующими константные области человека (или других нечеловеческих видов). Иллюстративные последовательности, кодирующие константные области антитела человека, включают SEQ ID NO: 106, которая кодирует константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 103), и SEQ ID NO: 107 и 108, которые кодируют константные области каппа-легкой цепи человека (SEQ ID NOS: 104 и 105 соответственно).

В одном из подходов вариабельные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для того, чтобы они кодировали соединенные донорные последовательности после соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор для экспрессии в клетках млекопитающего, такой как pCMV-hy1 для тяжелой цепи и pCMV-Mc1 для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области γ1 и C_κ человека как экзонные фрагменты после вставленной кассеты с вариабельной областью. После проверки последовательности векторы экспрессии с тяжелой цепью и легкой цепью могут быть совместно трансфицированы в клетки CHO для того, чтобы продуцировать химерные антитела. Среду, частично использованную клетками, собирают через 48 ч после трансфекции и анализируют Вестерн-блот-анализом на продуцирование антител, или ELISA на связывание антигена. Химерные антитела гуманизированы, как описано выше.

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

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

E. coli представляет собой одного прокариотического хозяина, полезного для экспрессии антител, в частности фрагментов антител. Микробы, такие как дрожжи, также полезны для экспрессии. *Saccharomyces* представляет собой дрожжевого хозяина с подходящими векторами, имеющими последовательности контроля экспрессии, точку начала репликации, последовательности терминации транскрипции и тому подобное по желанию. Типичные промоторы включают 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают, среди прочего, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

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

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

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

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

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

Может быть использована методика коммерческого производства антител, включая оптимизацию кодонов, подбор промоторов, выбор элементов транскрипции, выбор терминаторов, клонирование из одной клетки без сыворотки, создание стока клеток, использование маркеров отбора для амплификации количества копий, терминатора СНО или улучшение титров белка (см., например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, WO 2004/050884, WO 2008/012142, WO 2008/012142, WO 2005/019442, WO 2008/107388, WO 2009/027471 и US 5888809).

Н. Скрининговые исследования антитела.

Антитела могут подвергаться нескольким исследованиям, включая исследования связывания, исследования функциональности, исследования на животных моделях заболеваний, связанных с отложениями TTR, и клинические испытания. Исследования связывания тестируют специфическое связывание и, необязательно, аффинность и специфичность к эпитопу, с мономерным TTR или его фрагментом. Например, в анализах связывания могут подвергаться скринингу антитела, которые связываются с аминокислотными остатками 89-97 (SEQ ID NO: 113) TTR, представляющими собой эпитоп, который погружен в нативном тетрамере TTR и экспонирован в мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной формах TTR. Антитела также могут быть подвергнуты скринингу на способность связывать префибриллярные, ненативные конформации TTR и амилоидные фибриллы TTR, но не нативные конформации TTR. Например, антитела могут быть подвергнуты скринингу на способность связываться с мономерными формами TTR, созданными путем диссоциации или дезагрегации нативного тетрамерного TTR, и могут быть в тоже время подвергнуты скринингу против нативного тетрамерного TTR, как описано в примерах, или иным образом. Аналогично, антитела также могут быть подвергнуты скринингу на их иммунореактивность в отношении ткани, подверженной TTR-опосредованному амилоидозу, но не на здоровой ткани. Такие исследования иногда проводят вместе с конкурентным иллюстративным антителом, таким как антитело, имеющее вариабельные области 9D5 или 14G8 (изотип каппа IgG1). Необязательно, в таком анализе иммобилизуют или антитело, или TTR-мишень.

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

Могут быть выполнены в растворе другие функциональные анализы, такие как проверка того, способны ли антитела нарушать или уменьшать образование фибрилл TTR, когда мономерный TTR или промежуточные формы неправильно свернутого TTR в растворе контактируют с антителом. Степень образования фибрилл может быть исследована измерениями мутности, например, при 400 нм на спектрометре в УФ и видимой области спектра, оснащенном блоком управления температурой. Также может быть использован тиофлавин-Т для оценки степени формирования амилоидных фибрилл. Например, пятикратный молярный избыток тиофлавина-Т можно добавить к образцам TTR и оставить их при комнатной температуре на 30 мин перед проведением измерений. Флюоресценцию тиофлавина-Т можно наблюдать с помощью спектрофлуориметра (смотрите US 2014/0056904).

Исследования с применением животных моделей тестируют способность антитела к терапевтическому или профилактическому лечению признаков или симптомов на животной модели, моделирующей болезнь человека, связанную с накоплением TTR или отложениями TTR. К таким заболеваниям относятся типы TTR амилоидоза, такие как старческий системный амилоидоз (SSA - senile systemic amyloidosis), старческий сердечный амилоидоз (SCA - senile cardiac amyloidosis), семейная амилоидная полинейропатия (FAP - familial amyloid polyneuropathy), семейная амилоидная кардиомиопатия (FAC - familial amyloid cardiomyopathy) и селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA - central nervous system selective amyloidosis). Подходящими признаками или симптомами, которые можно наблюдать, являются присутствие и количество амилоидных отложений в различных тканях, таких как желудочно-кишечный тракт или сердце. Степень снижения количества амилоидных отложений можно определить сравнением с соответствующим контролем, таким как уровень отложений TTR амилоидов у контрольных животных, которые получили контрольное антитело (например, контрольное антитело с подобранным изотипом), плацебо или вовсе не получали лечения. Иллюстративная животная модель для тестирования активности против TTR амилоидоза представляет собой мышиную модель, несущую нуль-мутацию в эндогенном локусе Ttr мыши и человеческий мутантный ген TTR, содержащий мутацию V30M, которая связана с семейной амилоидной полинейропатией (смотрите, например, Kohno et al., Am. J. Path. 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso and Saraiva, FASEB J 20(2):234-239 (2006)). Также существуют подобные модели, включающие другие модели семейных вариантов TTR амилоидоза и модели для спорадических вариантов TTR амилоидоза (см., например, Teng et al., Lab. Invest. 81(3): 385-396 (2001); Ito and Maeda, Mouse Mod-

els of Transthyretin Amyloidosis, in *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure and Biological Functions*, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg)). Трансгенные животные могут содержать человеческий трансген TTR, такой как трансген TTR с мутацией, ассоциированной с TTR амилоидозом, или трансген TTR дикого типа. Чтобы облегчить тестирование на животных моделях, можно использовать химерные антитела, имеющие константную область, подходящую для животной модели (например, химерные антитела мыша-крыса можно использовать для тестирования антител на крысах). Можно сделать вывод, что гуманизованная версия антитела будет эффективной, если соответствующее антитело мыши или химерное антитело будет эффективным в соответствующей животной модели, и гуманизованное антитело имеет сходную аффинность связывания (например, в пределах экспериментальной ошибки, например, при коэффициенте 1,5, 2 или 3).

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

I. Нуклеиновые кислоты.

В изобретении дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелых и легких цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96 и 106-108). Необязательно, такие нуклеиновые кислоты дополнительно кодируют сигнальный пептид и могут быть экспрессированы с сигнальным пептидом, соединенным с константной областью (например, сигнальные пептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 88 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 43 и 90 (легкая цепь), которые могут кодироваться соответственно SEQ ID NOS: 40 и 87 (тяжелая цепь) и соответственно SEQ ID NO: 42 и 89 (легкая цепь)). Кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, такими как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть в выделенной форме или могут быть клонированы в один или несколько векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, путем твердофазного синтеза или ПНР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной сплошной нуклеиновой кислоты, например, внутри вектора экспрессии, или могут быть отдельными, например каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела.

Конъюгированные антитела, специфически связывающиеся с антигенами, экспонированными в патогенных формах TTR, но не в нативных тетрамерных формах TTR, такими как аминокислотные остатки 89-97 (SEQ ID NO: 113) TTR, полезны для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR; наблюдения и оценки эффективности терапевтических средств, используемых для лечения пациентов с диагнозом TTR амилоидоз; ингибирования или снижения агрегации TTR; ингибирования или уменьшения образования фибрилл TTR; уменьшения количества или удаления отложений TTR; стабилизации нетоксичных конформаций TTR или лечения или осуществления профилактики TTR амилоидоза у пациента. Например, такие антитела могут быть конъюгированы с другими терапевтическими фрагментами, другими белками, другими антителами и/или обнаруживаемыми метками (смотрите WO 03/057838; US 8455622).

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

Примеры подходящих терапевтических фрагментов включают лекарственные средства, которые снижают уровни TTR, стабилизируют нативную тетрамерную структуру TTR, ингибируют агрегацию TTR, разрушают фибриллы TTR, или мешают образованию амилоида, или противодействуют токсичности для клетки (смотрите, например, Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001); Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013); Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012) и Johnson et al., *J. Mol. Biol.* 421 (2-3): 185-203 (2012)). Например, антитела могут быть конъюгированы с тафамидом, дифлуниазом, ALN-TTR01, ALNTTR02, ISIS-TTRRx, доксициклином (doxy), таурорсодезоксихолевой кислотой (TUDCA), Doxy-TUDCA, галлатом эпигаллокатехина (EGCG), куркумином или ресвератролом (3,5,4'-тригидроксистерильбеном). Другие репрезента-

тивные терапевтические фрагменты включают другие вещества, которые, как известно, полезны для лечения, контроля или улучшения TTR амилоидоза или симптомов TTR амилоидоза (см., например, Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)) для общеизвестных клинических симптомов TTR амилоидоза и типичных веществ, используемых для лечения таких симптомов.

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

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

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

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

Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы прямо или косвенно через посредника (например, линкер) с антителом по данному изобретению (смотрите, например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)). Подходящие линкеры включают, например, отщепляемые и неотщепляемые линкеры. Можно применять различные линкеры, которые высвобождают присоединенные терапевтические фрагменты, белки, антитела и/или детектируемые метки в кислотных или восстановительных условиях, при воздействии специфических протеаз или в других определенных условиях.

V. Терапевтические применения.

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

Антитела вводят эффективной схемой, что обозначает дозировку, способ введения и частоту введения, которая задерживает начало проявления симптомов, уменьшает тяжесть заболевания, замедляет дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один признак или симптом расстройства, что подвергается лечению. Если пациент уже страдает от расстройства, схему можно обозначить как терапевтически эффективная схема. Если пациент подвергается повышенному риску заболевания по сравнению с общей популяцией, но еще не испытывает симптомов, схему можно назвать профилактически эффективной схемой. В некоторых случаях можно наблюдать терапевтическую или профилактическую эффективность у отдельного пациента по сравнению с историческими контролями или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом исследовании на популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией необработанных пациентов.

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

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

VI. Фармацевтические композиции и способы их применения.

В данном документе приведены несколько способов диагностики, мониторинга, лечения или осуществления профилактики заболеваний или состояний, опосредованных, по меньшей мере, частично транстиретином (TTR) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной формами TTR (например, TTR амилоидоз). Примеры таких заболеваний включают наследственные TTR амилоидозы, такие как наследственная амилоидная кардиомиопатия (FAC), наследственная амилоидная полинейропатия (FAP) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA), и спорадические амилоидозы TTR, такие как старческий системный амилоидоз (SSA) или старческий сердечный амилоидоз (SCA). Антитела, описанные выше, могут быть включены в фармацевтическую композицию для использования в таких способах. В целом, как правило, антитело или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидов с риском TTR амилоидоза, но не проявляющих симптомов, а также пациентов, которые в настоящее время проявляют симптомы. Некоторых пациентов можно лечить во время продромальной стадии TTR амилоидоза.

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

Индивиды, страдающие от TTR амилоидоза, могут иногда быть распознаны по клиническим проявлениям TTR амилоидоза, включая одно или несколько из следующих: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) невропатическая боль или

прогрессирующие сенсорные нарушения неизвестной этиологии; 3) синдром кистевого туннеля без очевидной причины, особенно если он двусторонний и требует хирургического устранения; 4) нарушения моторики желудочно-кишечного тракта или дисфункция автономной нервной системы неизвестной этиологии (например, эректильная дисфункция, ортостатическая гипотензия, нейрогенный мочевой пузырь); 5) сердечная болезнь, характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атриовентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты (смотрите Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)). Окончательный диагноз TTR амилоидоза обычно основывается на биопсии органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя Congo red. Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание для TTR, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является TTR. Для наследственных форм заболеваний необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем TTR, до постановки окончательного диагноза.

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

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

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

Схема считается терапевтически или профилактически эффективной, если отдельный субъект, прошедший лечение, достигает более благоприятного исхода, чем средний исход в контрольной популяции сопоставимых субъектов, не прошедших лечение описанными в данном документе способами, или если демонстрируется более благоприятный исход для схемы у прошедших лечение субъектов по сравнению с контрольными субъектами в контролируемом клиническом исследовании (например, фаза II, фаза II/III или фазы III исследования), или на животной модели на уровне $p < 0,05$, или 0,01, или даже 0,001.

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

Эффективные дозы варьируют в зависимости от многих различных факторов, таких как способ введения, целевая локализация, физиологическое состояние субъекта, независимо от того, является ли субъ-

ект человеком или животным, других вводимых лекарств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

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

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

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

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

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

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

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

А. Способы диагностики и мониторинга.

Также предложены способы обнаружения иммунного ответа против TTR у пациента, страдающего или подверженного заболеваниям, связанным с отложениями TTR или патогенными формами TTR (например, мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами TTR). Способы могут использоваться для контроля курса терапевтического и профилактического лечения с помощью предлагаемых здесь веществ. Профиль антител после пассивной иммунизации обычно показывает непосредственный пик концентрации антител с последующим экспоненциальным разрушением. Без

дополнительной дозы распад приближается к предшествующим лечению уровням в период от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от периода полувыведения вводимого антитела. Например, период полувыведения некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

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

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

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

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

Диагностические реагенты могут быть введены в организм субъекта путем внутривенной инъекции или другими путями, которые считаются разумными. Доза реагента должна быть в тех же пределах, что и для способов лечения. Как правило, реагент метят, хотя в некоторых способах первичный реагент с аффинностью к мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной формам TTR является немеченым, а вторичный меченый реагент используется для связывания с первичным реагентом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Использование парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки также могут быть обнаружены с использованием ПЭТ или ОФЭКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии).

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

IX. Наборы.

В изобретении дополнительно предложены наборы (например, контейнеры), содержащие антитело, раскрытое в данном документе, и связанные с ним материалы, такие как инструкции для использования

(например, вкладыш в упаковке). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции для введения антитела и, необязательно, одно или несколько дополнительных веществ. Контейнеры с антителом могут быть в форме одиночных доз, многоразовых упаковок (например, упаковок с несколькими дозами) или субъединичных доз.

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

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

Х. Другие применения.

Антитела могут быть использованы для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм транстиретина (TTR) или их фрагментов в контексте клинической диагностики или лечения или в исследованиях. Например, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR в биологическом образце в качестве индикатора того, что биологический образец содержит отложения TTR амилоида. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить со связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки одинакового тканевого происхождения. Контрольные образцы и биологические образцы могут быть получены от тех же или разных лиц и в том же отборе проб или в разных отборах проб. При желании множество биологических образцов и множество контрольных образцов оценивают при многочисленных отборах проб, чтобы избежать случайного отклонения, независимого от различий между образцами. Затем может быть проведено прямое сравнение между биологическим образцом(-ами) и контрольным образцом (-ами), чтобы определить, увеличивается ли, уменьшается ли или остается таким же связывание антитела (т.е. присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR) с биологическим образцом(-ами) относительно связывания антитела с контрольным образцом (-ами). Повышенное связывание антитела с биологическим образцом(-ами) по сравнению с контрольным образцом(-ами) указывает на присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR в биологическом образце(-ах). В некоторых случаях повышенное связывание антитела является статистически значимым. Необязательно, связывание антитела с биологическим образцом является по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз или в 100 раз более сильным, чем связывание антитела с контрольным образцом.

Кроме того, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR в биологическом образце для наблюдения и оценки эффективности лекарственного средства, что применяется для лечения пациента с диагностированным TTR амилоидозом. Оценивают биологический образец от пациента с диагнозом TTR амилоидоз, чтобы установить исходный уровень связывания антител с образцом (т.е. исходный уровень наличия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR в образце) перед началом терапии лекарственным препаратом. В некоторых случаях множество биологических образцов от пациента оцениваются при множестве отборов проб, чтобы установить как исходное значение, так и меру случайного отклонения, не зависящего от лечения. Затем лекарственный препарат вводят согласно схеме приема лекарства. Схема может включать множество введений вещества в течение определенного периода времени. Необязательно, связывание антител (т.е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR) оценивается при множественном отборе проб по множеству биологических образцов из пациента, как для определения меры случайного отклонения, так и для демонстрации тенденции в ответ на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с биологическими образцами. Если будут сделаны только два оценивания, можно провести прямое сравнение между двумя оцениваниями, чтобы определить, увеличилось ли, уменьшилось ли или оставалось неизменным связывание антитела между двумя оцениваниями (т.е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR). Если проведено более двух измерений, измерения могут быть проанализированы как временной курс, начинающийся до лечения лекарственным препаратом и длящийся все время терапии. Для пациентов, у которых уменьшилось связывание антител с биологическими образцами (т.е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фебрильной форм TTR), можно сделать вывод, что лекарственный препарат был эффективным при лечении TTR амилоидоза у пациента. Снижение связывания антител может быть статистически значимым. Необязательно, связывание уменьшается по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Оценка связывания антитела может быть проведена в сочетании с оценкой других признаков и симптомов TTR амилоидоза.

Антитела также могут быть использованы в качестве исследовательских реагентов для лаборатор-

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

Антитела также могут быть использованы для ингибирования или уменьшения агрегации TTR, ингибирования или уменьшения формирования фибрилл TTR, уменьшения или устранения отложений TTR или агрегатов TTR или стабилизации нетоксичных конформаций TTR в биологическом образце. Биологический образец может содержать, например, кровь, сыворотку, плазму или ткань (например, ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почки, глаза или желудочно-кишечного тракта). В некоторых случаях агрегация TTR, образование фибрилл TTR, или отложения TTR ограничиваются или снижаются по меньшей мере на 10, 20, 25, 30, 40, 50 или 75% (например, 10-75% или 30-70%). Анализы для обнаружения образования фибрилл описаны в другом месте в данном документе (см. также US 2014/0056904).

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

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител к mis-TTR.

Конформационно-специфичные моноклональные антитела против мономерной, неправильно свернутой, фибриллярной или агрегированной форм TTR (mis-TTR) создавали, подвергали скринингу, экспрессировали и очищали, как описано в "Материалы и способы" (a-d). Для создания моноклональных антител к mis-TTR была исследована кристаллическая структура тетрамерного TTR человека, чтобы найти области белка, которые погружены в тетрамере, но становятся экспонированными при диссоциации тетрамера на его мономерные субъединицы. В идентифицированной области были остатки 89-97 (EHAEEVFTA) (SEQ ID NO: 113), расположенные в пределах F-цепи TTR и разделенные на границе раздела димера тетрамерного белка. Поиск BLAST в белковой базе данных не выявил каких-либо других человеческих белков, обладающих этой последовательностью.

Был синтезирован пептид, содержащий эту последовательность (ggEHAEEVFTAggkg) (SEQ ID NO: 114). Заглавные буквы представляют собой остатки 89-97 TTR. Буквы нижнего регистра представляют собой дополнительные линкерные остатки, добавляемые для увеличения растворимости антигенного пептида и для создания 9 аминокислотного фрагмента в качестве внутренней последовательности. Этот пептид был присоединен к полилизиновому разветвленному ядру, образуя многосоставный антигенный пептидный иммуноген (TTR-MAP), содержащий ядро из лизиновых остатков с несколькими ответвлениями, присоединенное к пептиду 89-97 TTR. Антитела, перечисленные в табл. 2, были получены против TTR-MAP.

В дополнение к этому многосоставному антигенному пептиду два других иммуногена, содержащих один и тот же фрагмент TTR, были получены путем ковалентного присоединения аналогичных пептидов 89-97 TTR (Ac-cggEHAEEVFTA-амид (SEQ ID NO: 115) и Ac-EHAEEVFTAcgg-амид (SEQ ID NO: 116)) через N- и C-концевые цистеиновые остатки к гемоцианину фиссуреллы (TTR89-97-N-KLH и TTR89-97-C-KLH).

После создания, скрининга, экспрессии и очистки антител были определены подробные кинетические параметры связывания (скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константа аффинности связывания (K_D)) для "лидирующих" mis-TTR антител посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR - surface plasmon resonance) в паре с рекомбинантным человеческим TTR F87M/L110M, как показано в табл. 2. Антимышинный IgG (GE Healthcare) был иммобилизован на сенсорном чипе C5 (без цепей декстрана) через аминокислотное соединение в соответствии с инструкциями, представленными в антимышинном наборе GE Healthcare, а mis-TTR mAb (мышинные антитела к ненативным формам TTR)

были захвачены до уровня, чтобы обеспечить максимальное связывание анализита до 30-50 RU (resonance units - резонансных единиц). Различные концентрации анализита (рекомбинантный человеческий TTR F87M/L110M) пропускали через захваченный лиганд при 30 мкл/мин в подвижном буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратных разведениях. Для каждой концентрации реакция протекала в течение времени, позволяющем более высоким концентрациям анализита достичь равновесия во время ассоциации, а также по меньшей мере 10% сигнала до распада во время диссоциации. По меньшей мере одна концентрация (не самая высокая или самая низкая) была проанализирована с дублирующей пробой. Диапазоны концентрации анализита были выбраны на основе предварительных экспериментов, чтобы охватить пределы измерений по меньшей мере от в 10 раз выше K_D до в 10 раз ниже K_D .

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

Таблица 2

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

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

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

Четыре "лидирующих" mis-TTR mAb (9D5, 14G8, 6C1 и 5A1) анализировали с помощью ELISA в концентрациях от 0,31 до 2,5 мкг/мл, используя как pH 4,0-обработанный TTR (pH4-TTR), так и нативный TTR в качестве покрывающего антигена. Подготовка антигена TTR и протоколы ELISA описаны в других местах, в разделе "Материалы и способы" (и т.п.).

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

Таблица 3

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

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

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

9D5 и 14G8 были проанализированы с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга, чтобы продемонстрировать специфичность связывания с мономерными/денатурированными формами TTR по сравнению с нативным, неденатурированным TTR. Протоколы ДСН-ПААГ-электрофореза, нативного ПААГ-электрофореза и Вестерн-блоттинга описаны в других местах, в разделе "Материалы и способы" (h-j).

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

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

Окрашенный гель ДСН-ПААГ показал, что основными видами, присутствующими в неденатурированном образце TTR, был димер примерно 38 кДа. Напротив, основной компонент, присутствующий в образце pH4-TTR, был димером примерно 35 кДа, с небольшой частью димера мономера примерно 15

кДа. Этот димер проходил через гель как немного меньший белок, чем димер, присутствующий в денатурированном образце TTR, что указывает на конформационную разницу между этими двумя видами димеров TTR.

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

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

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

Все четыре mAb к mis-TTR впоследствии анализировали с помощью нативного ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга. Как и ожидалось, и аналогично 9D5, другие mAb к mis-TTR, 14G8, 6C1 и 5A1, специфически связываются с высокомолекулярными ненативными формами TTR, присутствующими в образце pH4-TTR. Ни одно из этих антител не распознавало нативный димер TTR размером 35 кДа. Эти результаты указывают на то, что четыре mAb к mis-TTR ведут себя одинаково и распознают только ненативные виды TTR, которые конформационно отличаются от нативного TTR.

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

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

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

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

Таблица 4

Таблица результатов анализа характеристик
mAb к mis-TTR-Y78F

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

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

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

Таблица 4a

Таблица результатов анализа характеристик
mAb к mis-TTR-V122I

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

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

"Лидирующие" mAb к mis-TTR, созданные к фрагменту белка транстиретина 89-97 TTR, были иммуногистохимически протестированы на свежемороженой и обработанной парафином ткани, взятой у пациентов с подтвержденным сердечным TTR амилоидозом. Протоколы для получения и подготовки образцов сердечной ткани, иммуногистохимии (ИНС - immunohistochemistry) и анализа изображений приведены в других местах, в "Материалах и способах" (1-о). Антитела, используемые для ИНС, описаны в табл. 5.

Таблица 5

Антитела, примененные для иммуногистохимического определения характеристик

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

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

Таблица 6

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

Пациент	Диагноз	Мутации TTR	Форма	Окрашивалось ли антителами к TTR?
Пациент 1	FAS	Ileu122	Замороженный	Да
Пациент 2	FAP	Дикий тип	Замороженный	Да
Пациент 3	FAP	84Ser	Замороженный	Да
Пациент 4	FAP	84Ser	Замороженный	Да
Пациент 5	1° AL	--	Замороженный	Нет
Пациент 6	1° AL	--	Замороженный	Нет
Пациент 7	ATTR	I0Arg	Замороженный	Да
Пациент 8	ATTR	V122I	Замороженный	Да
Пациент H1	ATTR	Val122Ile	FFPE	Да
Пациент H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	Да
Пациент H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	Да
Пациент H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Да
Пациент H5	Unk.	Senile Cardiac	FFPE	Да
Пациент H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Да

Мышиные моноклональные антитела (mAb к mis-TTR), полученные к фрагменту белка транстирентина 89-97 TTR, были иммуногистохимически протестированы на свежемороженой и обработанной

парафином ткани, взятой у пациентов с подтвержденным сердечным TTR амилоидозом. Каждое антитело к mis-TTR проявляло сильную иммунореактивность на сердечной ткани с ATTR. Темное окрашивание наблюдалось в отложениях во всем миокарде и сосудистой сети. Когда иммунореактивность сравнивали по окрашиванию Congo Red и тиофлавином-Т, большая часть иммунореактивности на ткани показало высокое соответствие между двулучепреломлением Congo red и Т-положительным окрашиванием тиофлавином. Это подтверждает бета-складчатая природа листа TTR амилоида, отложенного в этой ткани. 14G8, 9D5, 6C1 и 5A1 также обнаруживали преамилоидный TTR, присутствующий в областях миокарда, которые были TTR-иммуноположительными, но Congo red или тиофлавин-Т отрицательными. Секции как с применением контрольного антитела изотипа IgG, так и с недобавлением первичных антител были отрицательными для окрашивания во всех тестируемых тканях. Антитела, реакционноспособные по отношению к другим амилоидогенным белкам (легкие цепи лямбда и каппа, или амилоид А), были неактивными на сердечной ткани с ATTR, использованной в этом анализе, что указывает на то, что отложения были специфически характерными для TTR.

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

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

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

Сердечная ткань пациентов с подтвержденными диагнозами старческого системного амилоидоза или пациентов с подтвержденным FAC или FAP, вызванных точечными мутациями в гене TTR, также положительно окрашивается 14G8, 9D5, 6C1 и 5A1.

Эти результаты показывают, что антитела к TTR обладают способностью распознавать отложения TTR в сердечной ткани независимо от генотипа ATTR.

Другие несердечные ткани, которые, как известно, экспрессируют TTR, также исследовали на окрашивание антителами к mis-TTR и сравнивали с окрашиванием, полученным с использованием эталонного антитела DAKO. Как и ожидалось, печень, поджелудочная железа и сосудистое сплетение окрашивались положительно на TTR с использованием эталонного антитела DAKO. В противоположность этому 14G8 окрашивало только альфа-клетки поджелудочной железы, расположенные в островках Лангерганса, и сосудистое сплетение, что указывает на то, что некоторые из TTR, локализованные в этих органах, конформационно отличаются от TTR, экспрессирующихся в печени. Отсутствие иммунореактивности у mAb к mis-TTR в печени свидетельствует о том, что большое количество TTR, экспрессированного в ней, представляет собой, в основном, тетрамерный нативный TTR и не имеет экспонированного эпитопа mis-TTR. Аналогичные результаты были получены, когда одни и те же ткани окрашивались 9D5, 6C1 и 5A1.

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

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

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

Вышеуказанные Вестерн-блоты были отсканированы, а интенсивности комбинированного 9D5- или 5A1-реакционноспособного TTR-димера и полос мономеров были нанесены на график для каждого об-

разца. Результаты показаны на фиг. 5A (9D5) и 5B (5A1) и представлены в произвольных единицах (п.е.) по оси у. За исключением образцов плазмы № 15 и 18, образцы плазмы, полученные от обычных индивидов (11, 12, 19 и 20), содержали меньше 9D5- и 5A1-реакционноспособных димерных и мономерных видов, чем образцы, полученные от пациентов с V30M (21-25 и 27).

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

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

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

Пример 7. Дизайн гуманизированных антител 9D5.

Отправной точкой или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 9D5. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи зрелого m9D5 представлена как SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность легкой цепи зрелого m9D5 представлена как SEQ ID NO: 16. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены как SEQ ID NO: 13-15 соответственно (как определено по Кабату). Составная CDR-H1 по Чотия-Кабат представлена как SEQ ID NO: 117. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены как SEQ ID NO: 24-26 соответственно (как определено по Кабату). В этом примере используется нумерация Kabat.

Вариабельная каппа (Vk) цепь антитела m9D5 относится к подгруппе 2 мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 3 человека по Кабату. Вариабельная тяжелая (Vh) цепь антитела m9D5 относится к подгруппе 3d мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 3 по Кабату (смотрите Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991). CDR-L1 из 16 остатков относится к традиционному классу 4, CDR-L2 из 7 остатков относится к традиционному классу 1, а CDR-L3 из 9 остатков относится к традиционному классу 1 в Vk (смотрите Martin & Thornton, *J. Mol. Biol.* 263:800-15, 1996). Составная CDR-H1 из 10 остатков по Чотия-Кабат относится к традиционному классу 1, и CDR-H2 из 17 остатков относится к традиционному классу 1 (смотрите Martin & Thornton, *J. Mol. Biol.* 263:800-15, 1996). CDR-H3 не имеет традиционных классов.

Остатки в зоне взаимодействия доменов Vk и Vh являются такими, какие обычно можно наблюдать, за исключением Leu в позиции 47 в тяжелой цепи, поскольку обычно в этой позиции встречается Tyr. Эта позиция является кандидатом на обратное мутирование.

Был проведен поиск по белковым последовательностям в базе данных PDB (Deshpande et al., *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7, 2005) чтобы найти структуры, которые бы предоставили грубую структурную модель для 9D5. Кристаллическая структура fab антитела (код pdb 1MJU) (Ruzheinikov et al., *J. Mol. Biol.* 332(2): 423-435, 2003) был использован для структуры Vk, так как она имела хорошее разрешение (1,22 Å) и общее сходство последовательностей с Vk антитела 9D5, сохраняя ту же традиционную структуру для петли как и в 9D5. Для структуры Vh использовали мономерное антитело с кодом pdb 1SEQ (Cova-ceuszach et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57 (PT 9), 1307-1309, 2001), поскольку оно имело хорошее сходство последовательности и разрешение (2,0 Å), и оно имеет те же традиционные структуры CDR-H1 и CDR-H2, как и таковые Vh антитела 9D5. Мы моделировали цепь Vh антитела 9D5, также применяя структуру 1MQK, так как она имеет лучшее разрешение 1,28 Å (Ostermeier et al., *Proteins* 21(1):74-77, 1995). Программное обеспечение BioLuminate (лицензия от Schrodinger Inc.) использовалось для моделирования грубой структуры 9D5.

Поиск базы данных из NCBI, не содержащей избыточных белковых последовательностей, позволил выбрать подходящие каркасы антитела человека для переноса CDR мыши. Для Vh была выбрана тяжелая цепь Ig человека BAC02114 (GI: 21670209) (SEQ ID NO: 3) (Akahori et al., *Construction and characterization of antibody libraries: isolation of therapeutic human antibodies and application to functional genomics*, Direct Submission, July 25, 2001). Она имеет традиционную форму, как и в 9D5. Она является членом тяжелой

подгруппы 1 человека по Кабату. Vh из 9D5 имеет некоторые уникальные остатки каркаса, и любой человеческий акцептор каркаса не показывал очень высокой гомологии. Поэтому мы также использовали второй каркас, AAX82494 (GI: 62421461) (SEQ ID NO: 4) (Lundquist et al., Infect. Immun. 74(6), 3222-3231, 2006), чтобы создать гибридный каркас акцептора. Для Vk была выбрана каппа-легкая цепь человека с идентификационным номером NCBI ABC66952 (GI: 84798006) (Shriner et al., Vaccine 24(49-50)7159-7166, 2006) (SEQ ID NO: 18). Традиционные классы ее CDR-L1 и L2 такие же, как и в родительском Vk. Она является членом каппа-подгруппы 2 человека по Кабату.

Были сконструированы восемь вариантов варибельной области гуманизированной тяжелой цепи и пять вариантов варибельной области гуманизированной легкой цепи, содержащие различные перестановки замен (Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b и 5 (SEQ ID NOS: 5-12 соответственно) и Hu9D5VLv1-5 (SEQ ID NOS: 19-23, соответственно)) (табл. 7 и 8). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vh и Vk с обратными мутациями и другими мутациями на основе выбранных человеческих каркасов показаны в табл. 7 и 8 соответственно. Заштрихованные серым области в первом столбце в табл. 7 и 8 обозначают CDR, как определено по Чотия, а заштрихованные серым в остальных столбцах в табл. 7 и 8 обозначают CDR, как определено по Кабату. SEQ ID NOS: 5-12 и 19-23 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 9. Аминокислоты в позициях H42, H47, H69, H82, H82(b), H108, L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 в Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b и 5 и Hu9D5VLv1-5 приведены в табл. 10 и 11.

Таблица 7

Гуманизированные области Vh 9D5

№ остатка по Чотия	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	FR или CDR	VH 9D5 матри (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Acceptor Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
1	1	1	Fr1	E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	K	R	R	K	R	K	R	K	R
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR-H1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	T	E	G	T	T	T	T	T	T	T	T
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	T	A	A	T	A	T	A	A	T
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	D	G	G	E	G	G	G	G	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	R	G	G	R	G	R	G	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L	W	L	W	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	A	A	A	A	S	A	S	A	A
50	50	50	CDR-H2	E	Y	T	E	E	E	E	E	E	E	E
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	S	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR-H2	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N
53	53	54	CDR-H2	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	S
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	D	S	S	D	D	D	D	D	D	D	D
56	56	57	CDR-H2	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T
57	57	58	CDR-H2	T	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	F	I	I	F	F	I	F	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	S	S	T	S	T	S	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	S	N	N	S	N	S	N	S	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L	L
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	R	K	R	K	R	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	A	A	S	A	S	A	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	V	V	M	V	M	V	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	H	G	L	H	H	H	H	H	H	H	H
96	96	100	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR-H3	Y	Q	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR-H3	Y	G	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	S	Y	G	G	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	G	R	R	G	G	G	G	G	G	G	G
100A	100A	105	CDR-H3	G	Y	Y	G	G	G	G	G	G	G	G
100B	100B	106	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
100C	100C	107	CDR-H3	G	Y	F	G	G	G	G	G	G	G	G
100D	100D	108	CDR-H3	G	Y	-	G	G	G	G	G	G	G	G
100E	100E	109	CDR-H3	W	Y	-	W	W	W	W	W	W	W	W
100F	100F	110	CDR-H3	F	G	-	F	F	F	F	F	F	F	F
100G	100G	111	CDR-H3	F	M	-	F	F	F	F	F	F	F	F
101	101	112	CDR-H3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR-H3	V	V	Y	V	V	V	V	V	V	V	V
103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	T	M	T	T	L	T	L	T	L	T
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 8

Гуманизированные области V_h 9D5

№ остатка по Чюня	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	Fr или CDR	V _L 9D5 мыши (SEQ ID NO: 16)	Hu V _L Aceptor Fr Ace № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	P	P	A	A
9	9	9	Fr1	P	L	L	L	L	P	P
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	P	P	P	P	P	S
19	19	19	Fr1	V	A	A	A	A	V	V
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	S	N	S	S	S	S	S
27	27	27	CDR-L1	K	Q	K	K	K	K	K
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
27C	27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
27D	27D	31	CDR-L1	H	Y	H	H	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
28	28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N	N	N

29	29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G	G
30	30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	N	N	N
31	31	36	CDR-L1	T	N	T	T	T	T	T
32	32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
34	34	39	CDR-L1	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	F	Y	Y	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	R	R
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	R	S	R	R	R	R	R
51	51	56	CDR-L2	V	G	V	V	V	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR-L2	L	R	L	L	L	L	L
55	55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P	P

60	60	65	Fr3	D	D	D	D	S	S	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	D	D	A	A
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	R	R
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	M	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	H	A	H	H	H	H	H
92	92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L	L
93	93	98	CDR-L3	E	Q	E	E	E	E	E
94	94	99	CDR-L3	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y
95	95	100	CDR-	P	P	P	P	P	P	P

			L3							
96	96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K	K	K	K

Таблица 9

Обратные мутации и другие мутации V_H , V_L

Вариант V_H или V_L	Последовательность экзона акцептора V_H или V_L	Остатки каркаса донора
Hu9D5VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H47, H69, H82
Hu9D5VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H47, H69, H82, H82b
Hu9D5VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H42, H47, H108
Hu9D5VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H69, H82, H82b
Hu9D5VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H47, H108
Hu9D5VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H82, H82b
Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H47, H108
Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 12)	Идентификационные номера NCBI BAC02114 и AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно)	H42, H47, H82b
Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Идентификационные номера NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L36
Hu9D5VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Идентификационные номера NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Her
Hu9D5VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Идентификационные номера NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L60
Hu9D5VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Идентификационные номера NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70, L74
Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 23)	Идентификационные номера NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, L74

Таблица 10

Нумерация остатков каркаса по Кабату для обратных мутаций и других мутаций в областях Vh гуманизированных антител 9D5

Остаток	Тяжелая цепь BAC02114	Тяжелая цепь AAx82494	9D5 мыши	Hu9D5 VHv1	Hu9D5 VHv2	Hu9D5 VHv2b	Hu9D5 VHv3	Hu9D5 VHv3b	Hu9D5 VHv4	Hu9D5 VHv4b	Hu9D5 VHv5
H42	G	D	E	G	G	E	G	G	G	G	E
H47	W	W	L	L	L	L	W	L	W	L	L
H69	I	I	F	F	F	I	F	I	I	I	I
H82	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
H82b	S	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L
H108	T	T	T	T	T	L	T	L	T	L	T

Таблица 11

Нумерация остатков каркаса по Кабату для обратных мутаций и других мутаций в областях Vk гуманизированных антител 9D5

Остаток	Легкая цепь ABC66952	9D5 мыши	Hu9D5 VLv1	Hu9D5 VLv2	Hu9D5 VLv3	Hu9D5 VLv4	Hu9D5 VLv5
L8	P	A	P	P	P	A	A
L9	L	P	L	L	L	P	P
L18	P	S	P	P	P	P	S
L19	A	V	A	A	A	V	V
L36	Y	F	F	Y	Y	F	F
L39	K	R	K	K	K	R	R
L60	D	D	D	D	S	S	S
L70	D	A	D	D	D	A	A
L74	K	R	K	K	K	R	R

Выравнивание последовательности Vh 9D5 мыши (SEQ ID NO: 1) с модельными последовательностями мыши (1SEQ_N и 1MQK_H, SEQ ID NOS: 2 и 62 соответственно), последовательностями акцептора человека (BAC02114 и AAx82494; SEQ ID NOS: 3 и 4 соответственно) и последовательностями Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b и Hu9D5VHv5 (SEQ ID NOS: 5-12 соответственно) показано на фиг. 1A. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиции, в которых канонические, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 2, 49, 69, 71, 75, 80 и 94 по нумерации Kabat в табл. 7. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 24, 48 и 73 по нумерации Kabat в табл. 7. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 37, 39, 44, 47, 91, 93 и 103 по нумерации Kabat в табл. 7.

Выравнивание последовательности Vk 9D5 мыши (SEQ ID NO: 16) с модельной последовательностью мыши (1MJU_L, SEQ ID NO: 17), последовательностью акцептора человека (ABC66952, SEQ ID NO: 18) и последовательностями Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4 и Hu9D5VLv5 (SEQ ID NOS: 19-23, соответственно) показаны на фиг. 1B. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиции, в которых традиционные, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 4, 35, 46, 49, 66, 68 и 69 по нумерации Kabat в табл. 8. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 2, 48, 64 и 71 по нумерации Kabat в табл. 8. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 36, 38, 44, 47, 87, и 98 по нумерации Kabat в табл. 8.

Обоснования выбора позиций, указанных в табл. 9 и 11, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены следующие:

P8A: модель показывает изгиб в петле в этой позиции, поэтому была опробована обратная мутация на A для сглаживания этого.

L9P: модель показывает изгиб в петле в этой позиции, поэтому была опробована обратная мутация

на Р для смягчения этого.

P18S: Р в этой позиции встречается реже. Была опробована мутация на S, для того чтобы снизить искривление петли.

A19V: А и V в этой позиции встречаются одинаково часто. Была опробована мутация на V, для того чтобы снизить искривление петли.

Y36F: это остаток интерфейса, и обычно он представляет собой Y или F. Y имеет дополнительную гидроксильную группу, которая может потенциально влиять на упаковку LC+HC. Полярность Y36 может потенциально помешать размещению остатка H95 тяжелой цепи CRD-H3. Гомологическая модель показывает, что Y в этом положении будет формировать H-связь с F100(g) в H3 de-novo, что может привести к ограничению подвижности H3. Как F, так и Y использовались в отдельных версиях.

K39R: R формирует H-связи с соседними остатками в этой петле в отличие от K. Чтобы исключить какие-либо влияния на стабильность петли, была опробована мутация на R.

D60S: присутствие D в этом остатке показывает высокую степень риска протеолиза. В некоторых версиях он был заменен на S-остаток, наиболее часто встречающийся в этой позиции в клетках зародышевой линии человека. Это, как предсказано, повышает стабильность.

D70A: D подвержен риску протеолиза, поэтому была опробована мутация на A.

K74R: R, по-видимому, стабилизирует петлю по сравнению с K в этой позиции, поэтому была опробована обратная мутация на R.

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

G42E: E обладает ионными взаимодействиями с R в позиции 44. Чтобы исключить какое-либо влияние, которое могут иметь эти взаимодействия, в некоторых версиях была рассмотрена обратная мутация на E.

W47L: это остаток интерфейса, обычно W. В тяжелой цепи 9D5 мыши это L, тогда как в акцепторном каркасе антитела человека в этой позиции находится W. Хотя L и W являются неполярными, фенольное кольцо в W может потенциально воздействовать на упаковку легкая цепь:тяжелая цепь. W и L были включены в отдельные варианты.

I69F: это остатки вернье, часть основания CDR-H2. В соответствии с гомологической моделью ароматическое кольцо F в мышиных последовательностях представляет собой стек с ароматическим кольцом остатка Y59 CRD-H2. Остаток I в этой позиции нарушает эту укладку. I и F были включены в отдельные варианты.

M82S: M в этой позиции очень редко встречается в каркасе антитела человека. Более распространенными являются A или N. Изменение остатка на более распространенный S может уменьшить иммуногенность, которая может быть связана с редким M в этой позиции. Основываясь на модельных наблюдениях, существует вероятность того, что M взаимодействует с Leu80, который является остатком зоны вернье. M и S были включены в отдельные варианты.

S82(b)L: S присутствует в этой позиции как в мышиных, так и в человеческих каркасных последовательностях, но S в этой позиции является менее частым. Судя по тому, где этот остаток находится в модели, он, возможно, может вступить в контакт с антигеном. Известно, что остатки в каркасной области 3 тяжелой цепи изредка вносят вклад в связывание. S и L были включены в отдельные варианты.

T108L: L является наиболее частым остатком в человеческих каркасах в этой позиции, поэтому L был опробован в некоторых вариантах.

Поскольку для гуманизации варибельной области тяжелой цепи 9D5 использовались два акцепторных каркаса человека (BAC02114 и AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 3 и 4)), существуют определенные позиции каркаса, которые имеют разные аминокислоты в двух акцепторных каркасах. Гуманизированные варианты варибельной области тяжелой цепи 9D5 могут содержать каждую из двух аминокислот в этих остатках. Примеры позиций, в которых эти два акцептора различаются, включают позиции H19 (R или K), H40 (A или T), H44 (G или R), H49 (S или A), H77 (S или T), H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M) по нумерации Kabat. Обоснования выбора одной аминокислоты или другой в этих позициях заключаются в следующем.

H19 (R или K): R и K присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H40 (A или T): A и T присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H44 (G или R): G и R присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H49 (S или A): это остаток вернье, который упаковывается под CDR-H2. В последовательности мыши это A. Небольшая разность размеров и гидрофильный характер S могут потенциально нарушить основу CDR. S и A были включены в отдельные версии.

H77 (S или T): S и T присутствуют в двух рассмотренных каркасах акцептора человека, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H82a (N или S): N в этой позиции встречается намного реже, чем S. Более того, S, по-видимому,

способствует связыванию антигена. Мутация в S была опробована в некоторых вариантах.

H83 (R или K): K в каркасной области 3 находится близко к поверхности области связывания CDR. Замена его на R, который является более громоздким, чем K, может препятствовать размещению антигена. R встречается наиболее часто, и K является третьим по частоте встречаемости в человеческих каркасах в этой позиции. R и K были включены в отдельные варианты.

H84 (A или S): S и A присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H89 (V или M): V и M присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

Пять вариантов варибельной области гуманизированной легкой цепи и пять вариантов варибельной области гуманизированной тяжелой цепи:

Hu9D5VL вариант 1 (замена Y36F показана нижним регистром):

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)

Hu9D5VL вариант 2 (без замен):

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

Hu9D5VL вариант 3 (замена D60S показана нижним регистром):

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)

Hu9D5VL вариант 4 (P8A, L9P, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A и K74R показаны нижним регистром):

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)

Hu9D5VL вариант 5 (P8A, L9P, P18S, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A, и K74R показаны нижним регистром):

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSNGNTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 23)

Hu9D5VH вариант 1 (замены W47L, I69F и M82S показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQAPGKGLVIAEISNSGDTTYYP
DTVKGRFTISRDNKNSLYLQSNILRAEDTAVYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
TVSS (SEQ ID NO: 5)

Hu9D5VH вариант 2 (W47L, I69F, M82S и S82(b)L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQAPGKGLVIAEISNSGDTTYYP
DTVKGRFTISRDNKNSLYLQSNILRAEDTAVYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
TVSS (SEQ ID NO: 6)

Hu9D5VH вариант 2b (замены G42E, W47L и T108L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQTPKRLVIAEISNSGDTTYYP
TVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
VSS (SEQ ID NO: 7)

Hu9D5VH вариант 3 (замены I69F, M82S, M82S и S82(b)L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQAPGKGLVIAEISNSGDTTYYP
DTVKGRFTISRDNKNSLYLQSNILRAEDTAVYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
TVSS (SEQ ID NO: 8)

Hu9D5VH вариант 3b (замены W47L и T108L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQTPKRLVIAEISNSGDTTYYP
TVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
VSS (SEQ ID NO: 9)

Hu9D5VH вариант 4 (замены M82S и S82(b)L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQAPGKGLVIAEISNSGDTTYYP
DTVKGRFTISRDNKNSLYLQSNILRAEDTAVYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
TVSS (SEQ ID NO: 10)

Hu9D5VH вариант 4b (замены W47L и T108L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQTPKRLVIAEISNSGDTTYYP
DTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
TVSS (SEQ ID NO: 11)

Hu9D5VH вариант 5 (замены G42E, W47L и S82(b)L показаны нижним регистром):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMWVRQTPKRLVIAEISNSGDTTYYP
TVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCARHYYGGGYGGWFFDVWGQGTIV
VSS (SEQ ID NO: 12)

Анализ качества белка наряду с анализом потенциала к агрегации не выявил явных кластеров связанных с агрегацией остатков, представленных в каркасных областях легкой цепи или тяжелой цепи 9D5 или CDR (Wang et al., MAbs1(3): 254-267, 2009).

Пример 8. Кинетический анализ связывания гуманизированных антител 9D5.

Кинетику связывания всех гуманизированных вариантов 9D5, 9D5 мыши и химерного 9D5 с рекомбинантным человеческим TTR F87M/L110M определяли с помощью Biotec, как показано в табл. 12. Античеловеческий (GE Healthcare) был иммобилизован на сенсорном чипе C5 (без цепей декстрана) через аминокислотное соединение в соответствии с инструкциями, представленными в античеловеческом наборе GE Healthcare, а mAb были захвачены до уровня, чтобы обеспечить максимальное связывание аналита до 30-50 RU. Различные концентрации аналита (рекомбинантный человеческий TTR F87M/L110M) пропускали через захваченный лиганд при 50 мкл/мин в подвижном буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратных разведениях. Для каждой концентрации реакция протекала в течение времени, позволяющем более высоким концентрациям аналита достичь равновесия во время ассоциации, а также по меньшей мере 10% сигнала до распада во время диссоциации. По меньшей мере одна концентрация (не самая высокая или самая низкая) была проанализирована с дублирующей пробой. Диапазоны концентрации аналита были выбраны на основе предварительных экспериментов, чтобы охватить пределы измерений по меньшей мере от в 10 раз выше K_D до в 10 раз ниже K_D .

В табл. 12 приведены скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константа аффинности связывания (K_D) по Biotec мышинных, химерных и гуманизированных вариантов 9D5 для рекомбинантного человеческого TTR F87M/L110M.

Таблица 12
Аффинность связывания антигена антителами 9D5
к TTR человека (F87M/L110M)

Антитело	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax
9D5 мыши	2,72E + 04	493E-04	1,82E-08	31,55
Химерное 9D5	2,59E + 05	3,50E-04	1,35E-09	47,05
Hu9D5 H2L5	1,15E + 05	7,85E-04	6,84E-09	57,6
Hu9D5 H3L1	1,52E + 04	6,57E-04	4,32E-09	54,93
Hu9D5 H4L1	2,54E + 05	5,33E-04	2,09E-09	43,91

Эти результаты показывают, что аффинность 9D5 мыши к TTR-F87M/L110M ($K_D=1,82E-08M$) была слегка улучшена в химерном варианте 9D5 ($K_D=1,35E-09M$). Кроме того, полностью гуманизированные варианты 9D5 имеют сходные значения аффинности в узком нМ диапазоне. Hu9D5 H4L1 обладает самой сильной аффинностью ($K_D=2,09E-09$) среди гуманизированных вариантов 9D5.

Пример 9. Дизайн гуманизированных антител 14G8.

Отправной точкой или донорским антителом для гуманизации было мышинное антитело 14G8. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи зрелого m14G8 представлена как SEQ ID NO: 61. Аминокислотная последовательность легкой цепи зрелого m14G8 представлена как SEQ ID NO: 70. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены как SEQ ID NO: 67-69 соответственно (как определено по Кабату). Составная CDR-H1 по Чотия- Кабат представлена как SEQ ID NO: 118. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены как SEQ ID NO: 77-79 соответственно (как определено по Кабату). Вариантная версия CDR1 предоставлена как SEQ ID NO: 80. В этом примере используется нумерация Kabat.

Вариабельная каппа (Vk) антитела m14G8 относится к подгруппе 2 мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 2 человека по Кабату. Вариабельная тяжелая (Vh) антитела m14G8 относится к подгруппе 3d мыши по Кабату, что соответствует подгруппе 1 по Кабату (смотрите Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991). CDR-L1 из 16 остатков относится к традиционному классу 3, CDR-L2 из 7 остатков относится к традиционному классу 1, а CDR-L3 из 9 остатков относится к традиционному классу 1 в Vk (смотрите Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996). Составная CDR-H1 из 10 остатков по Чотия- Кабат относится к традиционному классу 1, и CDR-H2 из 17 остатков относится к традиционному классу 1 (смотрите Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996). CDR-H3 не имеет традиционных классов, но петля из 15 остатков, вероятно, имеет изогнутую основу в соответствии с правилами Shirai et al., FEBS Lett. 455:188-97(1999).

Остатки в зоне взаимодействия доменов Vk и Vh являются такими, какие обычно можно наблюдать, за исключением L47, поскольку обычно в этой позиции встречается W.

Был проведен поиск по белковым последовательностям в базе данных PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005), чтобы найти структуры, которые предоставили бы грубую структурную модель 14G8. Кристаллическая структура Fab с активностью эстеразы (pdb 1MJU) использовалась в качестве модели для структуры Vk. Она была построена с разрешением 1,22 Å и содержит те же традиционные структуры для CDR-H1 и CDR-H2 и также содержит CDR-H3 такой же длины с изогнутым основанием. Для структуры Vh использовали Fv-фрагмент антитела 7E2 - антитела к цитохром-С оксидазе (код pdb 1MQK_H). Она имеет разрешение 1,28 Å и сохраняет ту же традиционную структуру для петель, как и в 14G8. Программное обеспечение BioLuminate (лицензия от Schrodinger Inc.) использовалось для моделирования грубой структуры 14G8.

Поиск базы данных из NCBI, не содержащей избыточных белковых последовательностей, позволил выбрать подходящие каркасы антитела человека для переноса CDR мыши. Для Vh были выбраны тяжелые цепи человеческого Ig с идентификационными номерами NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1. Они имеют общие традиционные формы с доменами CDR-H1 и H2 антитела 14G8, а H3 AAD30410.1 имеет длину 15 остатков с предсказанным изогнутым основанием. Для Vk были выбраны две человеческие капша-легкие цепи с идентификационными номерами NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1. Они имеют одинаковые традиционные классы для LCDR.

Были сконструированы три гуманизированных варианта вариабельной области тяжелой цепи и три гуманизированных варианта вариабельной области легкой цепи, содержащие различные перестановки замен (Hu14G8VHv1-3 (SEQ ID NO: 64-66 соответственно) и Hu14G8VLv1-3 (SEQ ID NOS: 74-76 соответственно)) (табл. 13 и 14). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vh и Vk с обратными мутациями и другими мутациями на основе выбранных человеческих каркасов показаны в табл. 13 и 14 соответственно. Заштрихованные серым области в первом столбце в табл. 13 и 14 обозначают CDR, как определено по Чотия, а заштрихованные серым в остальных столбцах в табл. 13 и 14 обозначают CDR, как определено по Кабату. SEQ ID NOS: 64-66 и 74-76 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в табл. 15. Аминокислоты в позициях H1, H3, H47, H105, L8, L9, L19, L26, L36, L60 и L70 в Hu14G8VHv1-3, и в Hu14G8VLv1-3 перечислены в табл. 16 и 17.

Таблица 13

Гуманизированные области Vh 14G8

№ остатка по Чотия	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	Fr1 или CDR	VH 14G8 мыши (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Акцептор Fr Ace № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Акцептор Fr Ace № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
1	1	1	Fr1	E	Q	Q	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	K	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	Q	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G

16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	R	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G
27	27	27	Fr1	F	F	F	F	F	F
28	28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T
29	29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F
30	30	30	Fr1	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	T	A	G	T	T	T
34	34	34	CDR-	M	M	M	M	M	M
			H1						
35	35	35	CDR-H1	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	T	T	T	T	T
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	E	D	E	E	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	A	A	A	A	A
50	50	50	CDR-H2	E	A	T	E	E	E
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-	N	S	S	N	N	N

			H2						
52A	52A	53	CDR-H2	N	T	S	N	N	N
53	53	54	CDR-H2	S	D	G	S	S	S
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	D	S	S	D	D	D
56	56	57	CDR-H2	T	F	Y	T	T	T
57	57	58	CDR-H2	T	I	T	T	T	T
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	T	T	S	T	T	T
63	63	64	CDR-	V	V	V	V	V	V
			H2						
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	G	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	S	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q

82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	S	S	S	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	S	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	M	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	K	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	H	D	L	H	H	H
96	96	100	CDR-H3	Y	R	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR-H3	Y	I	G	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	D	Y	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	G	A	R	G	G	G
100A	100A	105	CDR-H3	G	T	Y	G	G	G
100B	100B	106	CDR-H3	Y	A	Y	Y	Y	Y
100C	100C	107	CDR-H3	G	Q	F	G	G	G
100D	100D	108	CDR-H3	G	V	-	G	G	G
100E	100E	109	CDR-H3	W	G	-	W	W	W
100F	100F	110	CDR-H3	F	R	-	F	F	F
100G	100G	111	CDR-H3	F	F	-	F	F	F
101	101	112	CDR-H3	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR-H3	V	P	Y	V	V	V

103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	T	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	L	M	L	L	L
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S

Таблица 14

Гуманизированные области Vk 14G8

№ остатка по Чюпи	№ остатка по Кабату	Линейный № остатка	FR или CDR	V _L 14G8 матрица (SEQ ID NO: 70)	Hu V _L Acceptor Fr Acc № ABA 71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Hu V _L Acceptor Fr Acc № ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	T	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	A	P	P
9	9	9	Fr1	P	L	L	P	L	L
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	S	P	S	P	P
19	19	19	Fr1	V	A	A	V	A	A
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C

24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	N	S	N	N	N	S
27	27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K	K
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	27C	30	CDR-L1	L	R	L	L	L	L
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	Y	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	Y	S	S	S	S
27F	27F	33	CDR-L1	N	S	N	N	N	N
28	28	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
29	29	35	CDR-L1	N	Y	Y	N	N	N
30	30	36	CDR-L1	T	T	N	T	T	T
31	31	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
32	32	38	CDR-L1	L	I	L	L	L	L
33	33	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y	Y
34	34		CDR-L1						
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	Y	F	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	V	L	L	L	L

47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	R	L	S	R	R	R
51	51	56	CDR-L2	V	G	G	V	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L	L
55	55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D	D	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	A	D	D
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V

84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	H	A	A	H	H	H
92	92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L
93	93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E	E
94	94	99	CDR-L3	Y	T	S	Y	Y	Y
95	95	100	CDR-L3	P	V	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	C	Y	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	S	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I
106 A	106 A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K
107	107	113	Fr4	R	R	R	R	R	R

Таблица 15

Обратные мутации и другие мутации V_H, V_L

Вариант V _H или V _L	Последовательность экзона акцептора V _H или V _L	Остатки каркаса донора	Остатки CDR по Кабату
Hu14G8VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Идентификационные номера NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4 соответственно)	H1, H3, H47, H105	-
Hu14G8VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Идентификационные номера NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4 соответственно)	H1, H47	-
Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 66)	Идентификационные номера NCBI AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4 соответственно)	H1, H47	-
Hu14G8VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Идентификационные номера NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно)	L8, L9, L19, L36, L70	-
Hu14G8VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Идентификационные номера NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно)	L36	-
Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 76)	Идентификационные номера NCBI ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно)	L36, L60	L26

Таблица 16

Нумерация остатков каркаса и CDR по Кабату для обратных мутаций и других мутаций в гуманизированных областях V_H антитела 14G8

Оста-ток	AAD30410.1 Тяжелая цепь	AAX82494.1 Тяжелая цепь	14G8 мыши	Hu14G8 VHv1	Hu14G8 VHv2	Hu14G8 VHv3
H1	Q	Q	E	E	E	E
H3	Q	Q	K	K	Q	Q
H47	W	W	L	L	L	L
H105	Q	Q	T	T	Q	Q

Таблица 17

Нумерация остатков каркаса и CDR по Кабату для обратных мутаций и других мутаций в гуманизированных областях V_L антитела 14G8

Оста-ток	ABA71374.1 Легкая цепь	ABC66952.1 Легкая цепь	14G8 мыши	Hu14G8 VLv1	Hu14G8 VLv2	Hu14G8 VLv3
L8	P	P	A	A	P	P
L9	L	L	P	P	L	L
L19	A	A	V	V	A	A
L26	S	N	N	N	N	S
L36	Y	Y	F	F	F	F
L60	D	D	D	D	D	S
L70	D	D	A	A	D	D

Выравнивание последовательности V_H 14G8 мыши (SEQ ID NO: 61) с модельной последовательностью мыши (1MJU_L, SEQ ID NO: 62), последовательностями акцептора человека (AAD30410.1 и AAX82494.1; SEQ ID NO: 63 и 4 соответственно) и последовательностями Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2, и Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64-66 соответственно) показаны на фиг. 2A. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиции, в которых канонические, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 2, 49, 69, 71, 75, 80 и 94 по нумерации Kabat в табл. 13. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают

остатки 24, 48 и 73 по нумерации Kabat в табл. 13. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 37, 39, 44, 47, 91, 93 и 103 по нумерации Kabat в табл. 13.

Выравнивание мышиного 9D5 Vk 14G8 (SEQ ID NO: 70) с модельной последовательностью мыши (1MJU_L, SEQ ID NO: 71), последовательностями акцептора человека (ABA71374.1 и ABC66952.1; SEQ ID NOS: 72 и 73 соответственно), и последовательностями Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2, Hu14G8VLv3 (SEQ ID NOS: 74-76 соответственно) показаны на фиг. 2B. Последовательности CDR, как определено по Кабату, заключены в рамки, за исключением того, что первая охватывающая рамка является совмещением CDR-H1 по Чотия и CDR-H1 по Кабату, с подчеркнутым и выделенным полужирным шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиции, в которых канонические, верниальные или интерфейсные остатки различаются между последовательностями акцепторов мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры верниальных/CDR-основных остатков включают остатки 4, 35, 46, 49, 66, 68 и 69 по нумерации Kabat в табл. 14. Примеры традиционных/CDR-взаимодействующих остатков включают остатки 2, 48, 64 и 71 по нумерации Kabat в табл. 14. Примеры остатков интерфейса/упаковки (VH+VL) включают остатки 36, 38, 44, 47, 87, и 98 по нумерации Kabat в табл. 14.

Обоснования выбора позиций, указанных в табл. 15 и 17, в варибельной области легкой цепи в качестве кандидатов для замены, следующие:

P8A: пролин имеет решающее значение для формирования структуры, а потеря или добавление пролина может влиять на структуру. Были разработаны обратные мутации для того, чтобы избежать "добавления пролина". Однако, поскольку А в этой позиции редко встречается в каркасах IgG человека, Р был включен в некоторые варианты.

L9P: пролин имеет решающее значение для формирования структуры, а потеря или добавление пролина может влиять на структуру. Были разработаны обратные мутации для того, чтобы избежать "потери пролина". Однако, поскольку Р в этой позиции редко встречается в каркасах IgG человека, L был включен в некоторые варианты.

A19V: А и V имеют аналогичные частоты в каркасах человека. Оба остатка были включены в отдельные варианты.

N26S: L26 представляет собой сайт N-гликозилирования в CDR1 легкой цепи. Мутация в S уменьшает N-гликозилирование и дает более гетерогенный продукт.

Y36F: это интерфейсный остаток. В некоторых вариантах была сделана замена для того, чтобы сохранить остаток мыши в этом остатке интерфейса.

D60S: D и S сходны по частоте в каркасах IgG человека. S применяется большинством коммерчески доступных терапевтических антител, поэтому D был заменен на S в некоторых вариантах.

D70A: D встречается гораздо чаще, чем А в каркасах IgG человека. Однако D образует ионную связь с R24 в CDR1 легкой цепи, поэтому как А, так и D включены в отдельные варианты.

Обоснования выбора позиций, указанных в табл. 15 и 16, в варибельной области тяжелой цепи в качестве кандидатов для замены, следующие:

Q1E: преобразование глутамата (Е) в пироглутамат (pE) происходит медленнее, чем из глутамина (Q). Антитела становятся более кислотными из-за потери первичного амина глутамином при преобразовании в pE. Неполное преобразование создает гетерогенность в антителе, которую можно наблюдать как множественные пики, используя аналитические способы на основе заряда. Различия в гетерогенности могут указывать на отсутствие контроля процесса.

Q3K: Q чаще встречается в каркасах IgG человека. К реже, но не является редким. Оба остатка были включены в отдельные варианты.

W47L: это интерфейсный остаток. В некоторых вариантах была сделана замена для того, чтобы сохранить остаток мыши в этом остатке интерфейса.

Q105T: Т может образовывать водородную связь с K3, поэтому Т был включен в некоторые варианты для поддержания конформационной структуры VH.

Поскольку для гуманизации варибельной области легкой цепи 14G8 использовались два акцепторных каркаса человека (ABA71374.1 и ABC66952.1 (SEQ ID NOS: 72 и 73 соответственно)), существуют определенные позиции каркаса, которые имеют разные аминокислоты в двух акцепторных каркасах. Гуманизированные варианты варибельной области легкой цепи 14G8 могут содержать одну из двух таких аминокислот в этой позиции. Примером остатка, в котором эти два акцептора отличаются, является позиция L18 (S или Р) по нумерации Kabat. Обоснование выбора одной аминокислоты или другой в этой позиции заключается в следующем:

L18 (S или Р): Р в этой позиции встречается реже. Была опробована мутация на S, для того чтобы снизить искривление петли.

Поскольку для гуманизации варибельной области зрелой тяжелой цепи 14G8 использовались два акцепторных каркаса человека (AAD30410.1 и AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 и 4 соответственно)), существуют определенные позиции каркаса, которые имеют разные аминокислоты в двух акцепторных каркасах. Гуманизированные варианты варибельной области тяжелой цепи 14G8 могут содержать любую из таких аминокислот в этой позиции. Примеры остатков, в которых эти два акцептора различаются, включают позиции H82a (N или S), H83 (R или K), H84 (A или S) и H89 (V или M) по нумерации Kabat. Обос-

нования выбора одной аминокислоты или другой в этих позициях заключаются в следующем:

H82a (N или S): N и S имеют аналогичную частоту в 82a. Они также являются человеческими остатками в двух шаблонах VH человека. S и N были включены в отдельные варианты.

H83 (R или K): K в каркасной области 3 находится близко к поверхности области связывания CDR. Замена его на R может препятствовать размещению антигена. R встречается наиболее часто, и K является третьим по частоте встречаемости в человеческих каркасах в этой позиции. R и K были включены в отдельные варианты.

H84 (A или S): S и A присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

H89 (V или M): V и M присутствуют в двух рассмотренных каркасах, поэтому каждый остаток был опробован в отдельных вариантах.

Три варианта вариабельной области гуманизированной легкой цепи и три варианта вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи являются следующими:

Hu14G8VL вариант 1 (P8A, L9P, A19V, Y36F, D70A замены показаны нижним регистром):

DI VMTQ S_{ap}SLP VTPGES_vSISCRSNKSLHLSNGNTYLYW_lLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVP

DRFSGSGSGT_aFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 74)

Hu14G8VL вариант 2 (замена L36F показана нижним регистром):

DI VMTQSPLSLP VTPGEPASISCRSNKSLHLSNGNTYLYW_lLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGV

PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 75)

Hu14G8VL вариант 3 (замены N26S, L36F и D60S показаны нижним регистром):

DI VMTQSPLSLP VTPGEPASISCRS_sKSLHLSNGNTYLYW_lLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVP

sRFSFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 76)

Hu14G8VH вариант 1 (замены Q1E, Q3K, W47L и Q105T показаны нижним регистром):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVA_{EINNSG}DTTYYPD

TVKGRFTISRDN_{AKNT}LYLQMSS_{LK}SEDTAMYYCARH_{YYYGGGYGGW}FFD_{VWG}IGTLTV

VSS (SEQ ID NO: 64)

Hu14G8VH вариант 2 (замены Q1E и W47L показаны нижним регистром):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVA_{EINNSG}DTTYYPD

TVKGRFTISRDN_{AKNT}LYLQMSS_{LK}SEDTAMYYCARH_{YYYGGGYGGW}FFD_{VWG}QGT_{LV}

TVSS (SEQ ID NO: 65)

Hu14G8VH вариант 3 (замены Q1E и W47L показаны нижним регистром):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVA_{EINNSG}DTTYYPD

TVKGRFTISRDN_{AKNT}LYLQMNS_{LR}AEDTAVYYCARH_{YYYGGGYGGW}FFD_{VWG}QGT_{LV}

TVSS (SEQ ID NO: 66)

Пример 10. Кинетический анализ связывания гуманизированных антител 14G8.

Кинетика связывания трех гуманизированных вариантов 14G8 и 14G8 мыши с рекомбинантным человеческим TTR F87M/L110M исследовали с помощью Biacore, как показано в табл. 18. Античеловеческий (GE Healthcare) был иммобилизован на сенсорном чипе C5 (без цепей декстрана) через аминокислотное соединение в соответствии с инструкциями, представленными в античеловеческом наборе GE Healthcare, а mAb были захвачены до уровня, чтобы обеспечить максимальное связывание аналита до 30-50 RU. Различные концентрации аналита (рекомбинантный человеческий TTR F87M/L110M) пропускали через захваченный лиганд при 50 мкл/мин в подвижном буфере (HBS+0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратных разведениях. Для каждой концентрации реакция протекала в течение времени, позволяющем более высоким концентрациям аналита достичь равновесия во время ассоциации, а также по меньшей мере 10% сигнала до распада во время диссоциации. По меньшей мере одна концентрация (не самая высокая или самая низкая) была проанализирована с дублирующей пробой. Диапазоны концентрации аналита были выбраны на основе предварительных экспериментов, чтобы охватить пределы измерений по меньшей мере от в 10 раз выше K_D до в 10 раз ниже K_D .

В табл. 18 приведены скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константа аффинности связывания (K_D) мышиного 14G8, химерного-14G8, Hu14G8 H2L1, Hu14G8 H2L2, Hu14G8H2L3 и Hu14G8 H3L1 с рекомбинантным TTR F87M/L110M человека. Как показано в табл. 18, антитела Hu14G8 и 14G8 мыши имеют сходные аффинности связывания TTR.

Таблица 18

**Аффинность связывания антигена антителами
14G8 к TTR человека (F87M/L110M)**

Антитело	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max}
14G8 мыши	2,88E + 04	5,36E-04	1,86E-08	27,13
Химерное 14G8	2,51E + 05	3,46E-04	1,38E-09	51,06
Hu14G8 H2L1	3,07E + 05	6,93E-04	2,26E-09	42,03
Hu14G8 H2L2	3,26E + 05	6,83E-04	2,10E-09	51,43
Hu14G8 H2L3	2,52E + 05	3,18E-04	1,24E-09	42,41
Hu14G8 H3L1	3,86E + 05	6,77E-04	1,76E-09	44,05

14G8 мыши, химерное 14G8 и другая гуманизованная версия 14G8 без изменений в LCDR1 показали наличие дополнительных легких цепей при ДСН-ПААГ электрофорезе при восстанавливающих условиях. Анализ последовательности показал, что в LCDR1 имеется сайт N-гликозилирования в остатке 26 по нумерации Kabat. Этот сайт N-гликозилирования может вызывать потенциальные проблемы гетерогенности при производстве. Мутация N в остатке L26 в Hu14G8VLv2 давала Hu14G8VLv3. Гуманизованные антитела, имеющие Hu14G8VLv3, показывают только одну легкую цепь при ДСН-ПААГ электрофорезе в восстановительных условиях, тем самым устраняя потенциальную проблему гетерогенности. Аффинность связывания антигена антителом Hu14G8 H2L3 аналогична таковой родительского антитела мыши и химерного антитела.

Пример 11. Материалы и способы.

а. Протокол создания антител.

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

б. Протокол скрининга антител.

Отбор гибридомы основывался на следующем скрининге с помощью ELISA: 96-луночные плашки ELISA покрывали куриным анти-His, 1 мкг/мл ФСБ и инкубировали в течение 1 ч. Плашки блокировали 1%-ным раствором БСА/ФСБ, 200 мкл/луночка в течение 15 мин, затем добавляли 0,5 мкг/мл pH4-TTR, 50 мкл/луночка и инкубировали в течение 1 ч. pH4-TTR представляет собой TTR, который подвергли воздействию низкого pH (50 мМ ацетата натрия, pH 4,0) для того, чтобы диссоциировать/агрегировать TTR с целью экспонировать эпитоп TTR89-97. Плашки дважды промывали TBS-T. Добавляли супернатант из плашек гибридизации, 50 мкл/луночку и инкубировали в течение 1 ч. Плашки дважды промывали TBS-T. Добавляли антитело обнаружения, козье-антимышинное (IgG1, 2a, 2b, 3 специфичное)-HRP, разбавленное 1:5000 в 0,5% БСА/ФСБ/TBS-T, 50 мкл/луночка, и инкубировали в течение 1 ч. Наконец, плашки промывали пять раз субстратом TBS-T и TMB, добавляли 100 мкл/луночка. Через 15 мин проявление субстрата останавливали 2N серной кислотой, 50 мкл/луночка. Плашки считывали при 450 нм. Были выбраны лунки с OD>1,0, и клетки переносили в 24-луночную плашку. Через 3 дня роста клоны подвергали вторичному (counter) скринингу с помощью вышеуказанного анализа для подтверждения связывания и заменяя нативный TTR на pH4-TTR в качестве отрицательного вторичного скрининга, что позволяет выбирать клоны, продуцирующие mAb к TTR, специфичные к ненативным формам TTR.

с. Протоколы экспрессии антител.

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

Самый высокопродуктивный клон размножали во встряхиваемых колбах, и культуру использовали для инокуляции 10-25-литровых одноразовых биореакторов (WAVE Biotech). Смесь сред экспрессии FreeStyle-CHO, CD OptiCHO и FreeStyle F17, дополненных Glutamax (среда и Glutamax от Life Technology), использовали в встряхиваемых колбах, а также для культур в одноразовых биореакторах. Одноразовую (batch) культуру получали с использованием волнового биореактора (GE Healthcare) при 37°C, 7% CO₂ при постоянном перемешивании. Образцы периодически отбирали для контроля количества клеток, жизнеспособности и продуцирования антител. При необходимости вносили добавку Cell Boost (HyClone). Одноразовую культуру собирали, когда жизнеспособность клеток начинала становится ниже

90% (5-7 дней).

d. Протокол очистки антител.

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

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

e. Протоколы экспрессии и очистки рекомбинантного TTR.

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

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

f. Приготовление антигена TTR.

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

g. Протокол ELISA.

Покрытые и заблокированные 96-луночные плашки обрабатывали TTR-антигеном 50 мкл на лунку 2,5 мкг/мл (либо нативный TTR, либо pH4-TTR) в течение 1 ч при комнатной температуре. Плашки затем дважды промывали 250 мкл/лунка промывочного буфера (1×Трис-буферный солевой раствор, содержащий 0,05% Tween-20). Затем промытые плашки обрабатывали 50 мкл/лунка соответствующего моноклонального антитела против TTR в концентрациях от 0,31 до 2,5 мкг/мл в течение 1 ч.

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

h. ДСН-ПААГ электрофорез.

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

i. Нативный ПААГ электрофорез.

Электрофорез на нативных Трис-глициновых гелях проводили следующим образом. 0,1-1 мкг TTR

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

j. Вестерн-блоттинг.

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

k. Протокол анализа формирования фибрилл TTR.

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

Стоковый раствор TTR-V122I (примерно 5 мг/мл) разбавляли в буфере с конечными концентрациями TTR 0,2 мг/мл, 30 мМ ацетата натрия, 5 мМ фосфата натрия, 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 0,02% азида натрия и различными концентрациями моноклонального антитела при pH 7,2. Этот образец диализовали против того же буфера при pH 4,5 в течение 3 ч при комнатной температуре. Образцы затем инкубировали при 37°C в течение 72 ч. После инкубации к смеси добавляли 5X молярный избыток тιοфлавина-Т и оставляли связываться в течение 30 мин. Наблюдение флуоресценции тιοфлавина-Т осуществляли с использованием спектрофлуориметра Photon Technology International C60. Варьировали коэффициент усиления фотоумножителя, а ширину входной щели возбуждения и излучения устанавливали в пределах 2-4 нм, чтобы максимизировать сигнал по отношению к шуму. Измерения флуоресценции проводились с использованием 430 и 480 нм в качестве длин волн возбуждения и излучения соответственно.

l. Образцы сердечной ткани.

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

m. Иммуногистохимия.

Иммуногистохимия была выполнена на слегка закрепленных параформальдегидом 10 мкм криосрезах и на 5 мкм парафиновых срезах. Способ с иммунопероксидазой был основной системой детектирования, которое было выполнено на Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Буффало-Гроув, Иллинойс) с использованием набора для определения Refine Bond Polymer Refine Detection Kit (DS980, Leica Biosystems). Первичные антитела инкубировали в течение одного часа (в соответствии с концентрациями в табл. 2) с последующей инкубацией с конъюгатами антимышиных и антикроличьих антител с полимерным HRP-линкером. Окрашивание визуализировали с помощью хромогена DAB, который продуцировал коричневый осадок. Микропрепараты докрашивали гематоксилином, обезвоживали в восходящей серии спиртов, очищали в ксилолах и накрывали покрывным стеклом CytoSeal 60 (Richard Allen Scientific, Каламазу, Мичиган). Отрицательный контроль заключался в проведении всей иммуногистохимической процедуры на срезах соседних участков ткани с неиммунным изотопным контролем IgG или в отсутствие первичного антитела.

n. Обнаружение амилоида: покраска Congo Red и тιοфлавином-Т.

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

Для определения присутствия TTR амилоида в ткани использовали модифицированный протокол окрашивания тιοфлавином-Т (Schmidt et al., 1995). Если коротко, микропрепараты докрашивали с помощью гематоксилина Маера, промывали проточной водой и окрашивали отфильтрованным 0,015%-ным

раствором тиофлавина-Т (Т3516-25G, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в 50%-ном этаноле в течение 10 мин. Затем микропрепараты промывали в проточной воде и дифференцировали в 1% (об./об.) уксусной кислоте в течение 10 мин и промывали три раза в воде. Микропрепаратам давали высохнуть на воздухе до того, как они были покрыты ProLong Gold (Life Technologies).

о. Анализ изображений.

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

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

Шесть образцов плазмы от пациентов с подтвержденным V30M ATTR (образец №№ 11, 12, 15, 18, 19, 20) и 6 образцов от обычных субъектов (№№ 21, 22, 23, 24, 25, 27) были получены от М. Сарайва (M. Saraiva) (Университет Порту, Португалия). Образец № С6 был обычным образцом человеческой сыворотки, полученным из коммерческого источника (BioreclamationIVT). Эти образцы плазмы разделяли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, и проводили Вестерн-блоттинг с 9D5 или 5A1 следующим образом. Объем плазмы, равный 1,4 мкл, разбавляли 1:8 в 1×LDS буфер для образца в отсутствие восстановителя (Life Technologies). Образцы подвергали разделению с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и Вестерн-блоттингу с использованием 0,5 мкг/мл 9D5 или 5A1, как описано ранее.

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

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

г. Построение стандартной кривой MSD.

Чтобы количественно определить количество ненативного 6C1-реакционноспособного TTR-белка, присутствующего в образцах плазмы человека, стандартную кривую MSD строили с использованием рекомбинантного TTR-F87M/L110M в качестве 6C1-реакционноспособного стандарта TTR. Этот вариант TTR содержит две аминокислотные замены, которые препятствуют образованию тетрамеров и удерживают белок в мономерном состоянии (Jiang et al. (2001) Biochemistry 40, 11442-11452). Таким образом, этот вариант TTR распознается всеми mAb к mis-TTR и поэтому хорошо подходит для использования в качестве эталонного стандарта в анализе MSD.

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

После обработки детектирующим антителом плашки трижды промывали 150 мкл 1×TBST на объем лунки с последующим добавлением 150 мкл/лунка 1×Read Buffer T (MSD). Плашки считывали в средстве визуализации изображений MSD, и строили калибровочную кривую TTRF87M/L110M.

s. Анализ фагоцитоза.

1 мг/мл образца TTR-F87M/L110M, нативного TTR или агрегированного низким pH TTR-V30M, связывали через амин с красителем pHrodo в течение 15 мин при 37°C в соотношении белок:краситель примерно 15:4 в соответствии с спецификацией производителя (Thermo Scientific). Избыток pHrodo-метки удаляли диафильтрацией в спин-концентраторе с отсечением по молекулярной массе 10K (Pierce Thermo), и pHrodo-TTR ресуспендировали в 1×ФСБ.

Моноциты человека THP-1 культивировали в среде для культивирования клеток (RMPI, 10%-ная сыворотка IgG, пенициллин/стрептомицин). Аликвота 20-мкг/мл меченого pHrodo TTR была отдельно предварительно проинкубирована с 40 мкг/мл антитела при 37 °C в клеточной культуральной среде в течение 30 мин перед добавлением 5E+04 THP-1 клеток в 1:1 объемном соотношении. После инкубации

тканевой культуры (3 ч) клетки промывали средой для культивирования клеток три раза, инкубировали в среде в течение 10 мин, затем дважды промывали и ресуспендировали в FACS-буфере (1% ФБС (фетальная бычья сыворотка) в ФСБ). Интенсивность флуоресценции красного pHrodo детектировали с использованием фильтров красного канала Texas Red. Эпифлуоресцентная микроскопия была выполнена аналогичным образом. После анализа FACS оставшиеся клетки переносили на предметное стекло с лунками и визуализировали с помощью инвертированной микроскопии. Средняя интенсивность флуоресценции автоматически рассчитывалась путем усреднения относительных интенсивностей флуоресценции каждой отдельной клетки.

Пример 12. Антителозависимое поглощение TTR клетками THP-1.

TTR-F87M/L110M ковалентно маркировали флуоресцентным pH-чувствительным красителем pHrodo. Метка pHrodo имеет минимальную флуоресценцию при физиологическом pH, но флуоресценция усиливается при поглощении в средах с низким pH эндоцитарных везикул и, таким образом, обозначает клеточное поглощение меченых частиц. Моноциты THP-1 добавляли к pHrodo-меченому TTR (нативный или не нативный, TTR-F87M/L110M) после обработки или 14G8, или изотипным контрольным антителом. Низкие уровни флуоресценции наблюдались с каждым антителом, инкубированным с нативным TTR, и после инкубации контрольного антитела с ненативным TTR. Тем не менее, флуоресценция была увеличена после инкубации 14G8 с ненативным TTR (фиг. 7A), что указывает на то, что ненативный TTR не фагоцитируется эффективно в базовых условиях, однако добавление антител к mis-TTR специфически вызывает фагоцитоз ненативного TTR.

Также был продемонстрирован дозозависимый фагоцитоз крупных меченых pHrodo, агрегированных фибриллярных частиц TTR для каждого из mAb к mis-TTR (фиг. 7B). Максимальное антителозависимое поглощение различалось для каждого mAb к mis-TTR (6C1>9D5≈14G8>5A1), достигая плато при концентрациях mAb между 5-10 мкг/мл. Различные возможности антител могут отражать изотипные различия и связанные с ними изменения в эффекторной функции между четырьмя mAb к mis-TTR. Контроли, включая необработанные клетки или те, которые были обработаны изотипным контрольным IgG1, не демонстрировали обнаруживаемой или усиленной флуоресценции соответственно.

Пример 13. Оценка антител к mis-TTR в модели трансгенных мышей.

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

Трансгенных мышей разводят с использованием стандартных процедур, и уровни их циркулирующего hTTR оценивают с помощью ELISA. Для последующих исследований эффективности используют мышей с количеством hTTR в сыворотке, равным 200-400 мкг/мл. В первом блоке исследований изучают естественное отложение hTTR у трансгенных мышей. Обнаружение отложений hTTR начинают в возрасте 12 месяцев и повторяют каждые 3-6 месяцев после этого. Исследования эффективности начинают, когда у трансгенных мышей наблюдается приемлемое количество агрегатов. Животных делят на три группы лечения (n=10/группа) и обрабатывают еженедельно в течение четырех недель внутрибрюшинный дозой переносчика, контрольного антитела (изотипный контроль, 10 мг/кг тела) или антитела против hTTR (10 мг/кг тела). Через неделю после последней обработки мышей подвергают эвтаназии, ткани собирают и обрабатывают, а затем окрашивают для того, чтобы оценить количество и размер оставшихся отложений TTR. Используют количественные способы и статистику для определения уровня клиренса, наблюдаемого между группами.

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

Пример 14. Оценивание антител к mis-TTR в модели имплантата Matrigel.

Заявитель определил, что предварительно агрегированный hTTR может быть суспендирован в Matrigel (BD Bioscience, каталожный № 354263), которому дают возможность затвердеть, а затем можно поместить подкожно мышам. Через четыре недели после имплантации имплантат Matrigel сохранил свою структуру, и агрегированный hTTR все еще присутствовал в имплантате. Кроме того, имплантат хорошо переносился мышами, и антитела против hTTR были способны проникать и связываться с агрегатами, суспендированными в Matrigel. Исходя из этих сведений, проводится исследование эффективности антител. Животных усыпляют, и имплантат, содержащий предварительно агрегированный hTTR,

суппендированный в Matrigel, подкожно помещают мышам. После соответствующего периода восстановления мышей делят на три группы лечения (n=10/группа) и обрабатывают еженедельно в течение от двух до четырех недель внутрибрюшинной дозой переносчика, контрольного антитела (изотипный контроль, 10 мг/кг тела) или антитела против hTRR (10 мг/кг тела). После последней обработки мышей подвергают эвтаназии, кожу, содержащую имплантат, собирают и обрабатывают, а затем количество оставшихся отложений TTR оценивают с помощью гистологических и/или биохимических способов. Используют количественный анализ и статистику для определения уровня клиренса, наблюдаемого между группами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает транстиретин, содержащее три CDR тяжелой цепи по Кабату: CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 67, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 68 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 69, и три CDR легкой цепи по Кабату: CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 77, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 79.

2. Антитело, которое связывает транстиретин, содержащее три CDR тяжелой цепи по Кабату: CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 67, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 68 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 69, и три CDR легкой цепи по Кабату: CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 80, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 79.

3. Антитело, которое связывает транстиретин, содержащее три CDR тяжелой цепи по Кабату: CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 67, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 69, и три CDR легкой цепи по Кабату: CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 77, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 79.

4. Антитело, которое связывает транстиретин, содержащее три CDR тяжелой цепи по Кабату: CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 67, CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 69, и три CDR легкой цепи по Кабату: CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 80, CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 79.

5. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что содержит CDR-H1 по Кабату-Чотия (SEQ ID NO: 118).

6. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что содержит CDR-H1 по Кабату-Чотия (SEQ ID NO: 117).

7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой моноклональное антитело.

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой мышинное, химерное, гуманизированное или венированное антитело.

9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое имеет изотип IgG1 человека.

10. Антитело по любому из пп.1-8, которое имеет изотип IgG2 или IgG4 человека.

11. Антитело по любому из пп.1-10, которое является гуманизированным или химерным антителом при этом позиция H69 представляет собой F или I, где позиция пронумерована по Кабату.

12. Антитело по п.11, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, при этом позиция H19 представляет собой R или K, позиция H40 представляет собой A или T, позиция H44 представляет собой G или R, позиция H49 представляет собой S или A, позиция H77 представляет собой S или T, позиция H82a представляет собой N или S, позиция H83 представляет собой R или K, позиция H84 представляет собой A или S, и позиция H89 представляет собой V или M, где позиции пронумерованы по Кабату.

13. Антитело по п.12, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано в позиции H42 находится E, в позиции H47 находится L, в позиции H69 находится F, в позиции H82 находится S, в позиции H82b находится L, в позиции H108 находится L, в позиции L8 находится A, в позиции L9 находится P, в позиции L18 находится S, в позиции L19 находится V, в позиции L36 находится F, в позиции L39 находится R, в позиции L60 находится S, в позиции L70 находится A, и в позиции L74 находится R, где позиции пронумерованы по Кабату.

14. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях H47, H69 и H82 находятся соответственно L, F и S, где позиции пронумерованы по Кабату.

15. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н47, Н69, Н82 и Н82b находятся соответственно L, F, S и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

16. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях H42, H47 и H108 находятся соответственно E, L и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

17. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н69, Н82, и Н82b находятся соответственно F, S и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

18. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н47 и Н108 находится L, где позиции пронумерованы по Кабату.

19. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях H82 и H82b находятся соответственно S и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

20. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н42, Н47 и Н82b находятся соответственно Е, L и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

21. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позиции L36 находится F, где позиции пронумерованы по Кабату.

22. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позиции L60 находится S, где позиции пронумерованы по Кабату.

23. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 находятся соответственно A, P, V, F, R, S, A и R, где позиции пронумерованы по Кабату.

24. Антитело по п.13, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 и L74 находятся соответственно A, P, S, V, F, R, S, A и R, где позиции пронумерованы по Кабату.

25. Антитело по п.12, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее вариабельную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариабельную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, при этом позиция Н19 представляет собой R или K, позиция Н40 представляет собой A или T, позиция Н44 представляет собой G или R, позиция Н49 представляет собой S или A, позиция Н77 представляет собой S или T, позиция Н82а представляет собой N или S, позиция Н83 представляет собой R или K, позиция Н84 представляет собой A или S, и позиция Н89 представляет собой V или M, где позиции пронумерованы по Кабату.

26. Антитело по п.25, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее вариативную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-12, и вариативную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 19-23, при этом позиция Н19 представляет собой R или K, позиция Н40 представляет собой A или T, позиция Н44 представляет собой G или R, позиция Н49 представляет собой S или A, позиция Н77 представляет собой S или T, позиция Н82a представляет собой N или S, позиция Н83 представляет собой R или K, позиция Н84 представляет собой A или S, и позиция Н89 представляет собой V или M, где позиции пронумерованы по Кабату.

27. Антитело по п.26, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 5-12, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 19-23.

28. Антитело по п.27, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

29. Антитело по п.11, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее вариабельную область гуманизированной зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и вариабельную область гуманизированной зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 74-76, при этом позиция H82a представляет собой N или S, позиция H83 представляет собой R или K, позиция H84 представляет собой A или S, позиция H89 представляет собой V или M, и позиция L18 представляет собой S или P, где позиции пронумерованы по Кабату.

30. Антитело по п.29, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором по меньшей мере одна из следующих позиций занята указанной аминокислотой: в позиции Н1 находится Е, в позиции Н47 находится L, а в позиции L36 находится F, где позиции пронумерованы по Кабату.

31. Антитело по п.30, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н1 и Н47 находятся соответственно Е и L, где позиции пронумерованы по Кабату.

32. Антитело по п.30, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позиции L36 находится F, где позиции пронумерованы по Кабату.

33. Антитело по любому из пп.29-32, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором по меньшей мере одна из следующих позиций занята указанной аминокислотой: в позиции Н3 находится К, в позиции Н105 находится Т, в позиции L8 находится А, в позиции L9 находится Р, в позиции L19 находится V, в позиции L26 находится S, в позиции L60 находится S, а в позиции L70 находится А, где позиции пронумерованы по Кабату.

34. Антитело по п.33, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях Н3 и Н105 находятся соответственно К и Т, где позиции пронумерованы по Кабату.

35. Антитело по п.33, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях L8, L9, L19 и L70 находятся соответственно А, Р, V и А, где позиции пронумерованы по Кабату.

36. Антитело по п.33, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором в позициях L26 и L60 находится S, где позиции пронумерованы по Кабату.

37. Антитело по п.29, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее переменную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и переменную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 74-76, при этом позиция Н82а представляет собой N или S, позиция Н83 представляет собой R или К, позиция Н84 представляет собой А или S, позиция Н89 представляет собой V или М, и позиция L18 представляет собой S или Р, где позиции пронумерованы по Кабату.

38. Антитело по п.37, которое представляет собой гуманизированное антитело, содержащее переменную область зрелой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 64-66, и переменную область зрелой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 74-76, при этом позиция Н82а представляет собой N или S, позиция Н83 представляет собой R или К, позиция Н84 представляет собой А или S, позиция Н89 представляет собой V или М, и позиция L18 представляет собой S или Р, где позиции пронумерованы по Кабату.

39. Антитело по п.38, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 64-66, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-76.

40. Антитело по п.39, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, а переменная область зрелой легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

41. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-40, который связывает транстиретин.

42. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.41, который представляет собой Fab или Fab'2-фрагмент.

43. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.41, который представляет собой одноцепочечное антитело.

44. Антитело по любому из пп.11-40, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, а переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.

45. Антитело по п.44, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором константная область тяжелой цепи содержит мутацию в одной или нескольких позициях 234, 235, 236 и 237 по нумерации ЕС.

46. Антитело по п.44 или 45, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором константная область тяжелой цепи является таковой изотипа IgG1.

47. Антитело по п.44, которое представляет собой гуманизированное антитело, в котором переменная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 103 с С-концевым лизином или без него, и/или переменная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 104 или 105.

48. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь антитела, как описано в любом из пп.1-40 и 44-47, или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в любом из пп.41-43.

49. Нуклеиновая кислота по п.48, имеющая последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96 и 106-108.

50. Рекombинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.48 или 49.

51. Клетка-хозяин, трансформированная рекombинантным вектором экспрессии по п.50.

52. Способ гуманизации мышиного антитела по п.8, включающий:

а) сбор одного или больше акцепторных антител;

б) идентификацию аминокислотных остатков каркаса мышиного антитела по п.8, подлежащих со-

хранению;

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

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

причем антитело мыши представляет собой 9D5 или 14G8, при этом 9D5 характеризуется вариативной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и вариативной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 16, а 14G8 характеризуется вариативной областью зрелой тяжелой цепи SEQ ID NO: 61 и вариативной областью зрелой легкой цепи SEQ ID NO: 70.

53. Способ продуцирования гуманизированного, химерного или венированного антитела по п.8, включающий:

а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела по п.8, так что клетки секретируют антитело; и

б) очистку антитела от клеточной культуральной среды.

54. Способ создания клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело по п.8, включающий:

а) введение вектора, кодирующего тяжелую и легкую цепи указанного антитела по п.8 и маркер селекции в клетки;

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

в) выделение отдельных клеток из выбранных клеток; и

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

55. Способ по п.54, дополнительно включающий размножение клеток в селективных условиях и скрининг для обнаружения линий клеток, естественно экспрессирующих и секретирующих антитело в количестве по меньшей мере 100 мг/л/10⁶ клеток/24 ч.

56. Способ ингибирования или снижения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или подверженного риску его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

57. Способ ингибирования или снижения формирования фибрилл транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или подверженного риску его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43, тем самым ингибируя или уменьшая накопление транстиретина у субъекта.

58. Способ уменьшения количества отложений транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или подверженного риску его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43, тем самым уменьшая количество отложений транстиретина у субъекта.

59. Способ устранения агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или подверженного риску его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43, тем самым устраняя агрегаты транстиретина у субъекта по сравнению с субъектом, имеющим транстиретинопосредованный амилоидоз или находящимся под риском его развития, который не получал антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

60. Способ стабилизации нетоксичной формы транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или подверженного риску его развития, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43, тем самым стабилизируя нетоксичную форму транстиретина у субъекта.

61. Способ замедления начала проявления транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43.

62. Способ диагностирования транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца от субъекта с эффективным количеством антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43 и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с транстиретином, причем присутствие связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.

63. Способ по п.62, дополнительно включающий сравнение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом с связыванием антитела или антигенсвязывающего фрагмента с контрольным образцом, полученным от здорового субъекта, при этом повышенное связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.

64. Способ по п.63, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения.

65. Способ по любому из пп.62-64, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань.

66. Способ по п.65, отличающийся тем, что плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

67. Способ по любому из пп.56-66, отличающийся тем, что транстиретиноспосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз.

68. Способ по п.67, отличающийся тем, что наследственный транстиретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (FAC), наследственную амилоидную полинейропатию (FAP) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (CNSA).

69. Способ по п.67, отличающийся тем, что спорадический транстиретиновый амилоидоз представляет собой старческий системный амилоидоз (SSA) или старческий сердечный амилоидоз (SCA).

70. Способ по любому из пп.56-66, отличающийся тем, что транстиретиноспосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах или желудочно-кишечном тракте субъекта.

71. Способ выявления присутствия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий приведение в контакт биологического образца от субъекта, подозреваемого в наличии амилоидного накопления, с эффективным количеством антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43 и обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента указывает на наличие отложений транстиретина.

72. Способ по п.71, дополнительно включающий сравнение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом со связыванием антитела или антигенсвязывающего фрагмента с контрольным образцом, полученным от здорового субъекта, при этом повышенное связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с биологическим образцом относительно контрольного образца указывает на то, что субъект имеет транстиретиноспосредованный амилоидоз.

73. Способ по п.72, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки одинакового тканевого происхождения.

74. Способ по любому из пп.70-73, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляют собой кровь, сыворотку, плазму или плотную ткань.

75. Способ по п.74, отличающийся тем, что плотная ткань представляет собой ткань из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз или желудочно-кишечного тракта.

76. Способ определения количества отложений транстиретина у субъекта, включающий введение антитела по любому из пп.1-40 и 44-47 или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.41-43 и обнаружения присутствия связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента у субъекта, где присутствие связанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента определяется с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

	10	20	30	40
m9D5VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFE			
Модельное мышинное 1850 H	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFE			
Модельное мышинное 1MQR H	EVKLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFE			
Акцепторное человека BAC02114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Акцепторное человека AAX82494	QVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFD			
Ru9D5VHv1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Ru9D5VHv2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Ru9D5VHv2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFE			
Ru9D5VHv3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Ru9D5VHv3b	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFG			
Ru9D5VHv4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Ru9D5VHv4b	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQAPG			
Ru9D5VHv5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTHSVVRQTFE			
	50	60	70	80
m9D5VH	KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Модельное мышинное 1850 H	KRLEWVAIYISKGGSTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Модельное мышинное 1MQR H	KRLEWVASINNGGRTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Акцепторное человека BAC02114	KGLWVSITSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN			
Акцепторное человека AAX82494	KRLEWVAITSSGGSTYYPDVSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS			
Ru9D5VHv1	KGLLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQSN			
Ru9D5VHv2	KGLLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQSN			
Ru9D5VHv2b	KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Ru9D5VHv3	KGLWVSEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQSN			
Ru9D5VHv3b	KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Ru9D5VHv4	KGLWVSEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQSN			
Ru9D5VHv4b	KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMS			
Ru9D5VHv5	KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMN			

Фиг. 1A.1

	90	100	110	120	
m9D5VH	SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.1)		
Модельное мышинное 18EQ_H	SLKSEDTALYYCAR-GAMFGNDFKYPMDRNGGQTSVTVSS	123	(SEQ ID NO.2)		
Модельное мышинное 1MQK_H	SLKSEDTAMYYCVRHYYT-----YAMDYAGGQTTVTVSS	118	(SEQ ID NO.62)		
Акцепторное человека AAC02114	SLRAEDTAVYYCARSGGQSRYYIYGMGVAGGQTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.3)		
Акцепторное человека AAX82494	SLKSEDTAMYYCARLYYGYHYTF-----DYAGGQTMVTVSS	120	(SEQ ID NO.4)		
Hu9D5VHv1	SLKSEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.5)		
Hu9D5VHv2	LLRAEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.6)		
Hu9D5VHv2b	SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.7)		
Hu9D5VHv3	LLRAEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.8)		
Hu9D5VHv3b	SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.9)		
Hu9D5VHv4	LLRAEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.10)		
Hu9D5VHv4b	SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.11)		
Hu9D5VHv5	LLRAEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.12)		

Фиг. 1A.2

	10	20	30	40	
m9D5VL	DI VMTQAAPSVPTPGESVSI	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Модельное мышинное 1MJU_L	DI VMTQAAPSVPTPGESVSI	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Акцепторное человека ABC66952	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSNQSL	LYSNGYNYLW	40	
Hu9D5VLv1	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu9D5VLv2	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu9D5VLv3	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu9D5VLv4	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu9D5VLv5	DI VMTQSPSLPVTTPGEPASIS	CRSSKSL	LHSMGNTYLY	40	
	50	60	70	80	
m9D5VL	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTAFTLRI	80	
Модельное мышинное 1MJU_L	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTAFTLRI	80	
Акцепторное человека ABC66952	YLQKPGQSPQLLIYSGSNRAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu9D5VLv1	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu6C1VLv2	YLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu9D5VLv3	YLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu9D5VLv4	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu9D5VLv5	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
	90	100	110		
m9D5VL	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GAGTKLEL	112	(SEQ ID NO.16)	
Модельное мышинное 1MJU_L	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GAGTKLEL	112	(SEQ ID NO.17)	
Акцепторное человека ABC66952	SRVEADVGVVYCMQALQSPYTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.18)	
Hu9D5VLv1	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.19)	
Hu6C1VLv2	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.20)	
Hu9D5VLv3	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.21)	
Hu9D5VLv4	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.22)	
Hu9D5VLv5	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	112	(SEQ ID NO.23)	

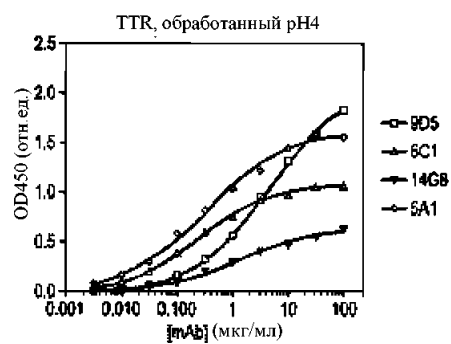
Фиг. 1B

		10	20	30	40	
m14G8VH		EVKLVS	GGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42	
Модельное мышинное 1MQK_H		EVKLVS	GGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42	
Акцепторное человека AAD30410		QVQLVQSGGGLVQPGGSRK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42		
Акцепторное человека AAX82494		QVQLVQSGGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42		
Hu14G8VHv1		EVKLVS	GGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42	
Hu14G8VHv2		EVKLVS	GGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42	
Hu14G8VHv3		EVKLVS	GGGLVQPGGSLK	SCAASGFTFSEYTHAVRQTP	42	
		50	60	70	80	
m14G8VH		KRLLELVASINNSGDTYYPD	TVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
Модельное мышинное 1MQK_H		KRLLELVASINNSGERTYYPD	TVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
Акцепторное человека AAD30410		KRLLELVASISTDGSFTYYAD	TVKGRFTISGDN	AKNTLYLQMS	84	
Акцепторное человека AAX82494		KRLLELVASISTGGSFTYYPD	SVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
Hu14G8VHv1		KRLLELVASINNSGDTYYPD	TVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
Hu14G8VHv2		KRLLELVASINNSGDTYYPD	TVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
Hu14G8VHv3		KRLLELVASINNSGDTYYPD	TVKGRFTISRDN	AKNTLYLQMS	84	
		90	100	110	120	
m14G8VH		SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.61)		
Модельное мышинное 1MQK_H		SLKSEDTAMYYCVRHYYT-----YAMDYAGGQTTVTVSS	118	(SEQ ID NO.62)		
Акцепторное человека AAD30410		SLRAEDTAVYYCANDRGIDATAQVGRPDFHGQSTLVTVSS	124	(SEQ ID NO.63)		
Акцепторное человека AAX82494		SLKSEDTAMYYCARLYYGYHYTF-----DYAGGQTMVTVSS	120	(SEQ ID NO.64)		
Hu14G8VHv1		SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.65)		
Hu14G8VHv2		SLKSEDTAMYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.66)		
Hu14G8VHv3		SLRAEDTAVYYCARHYIYGGGYGGWFFDVMGCTTVTVSS	124	(SEQ ID NO.66)		

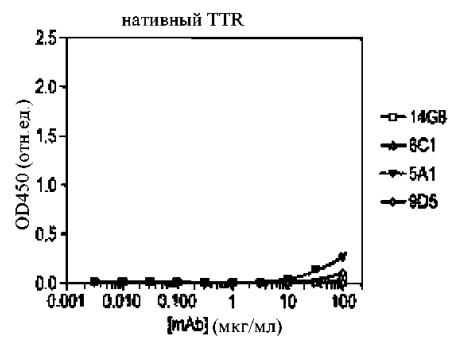
Фиг. 2A

	10	20	30	40	
m14G8VL	DI VMTQAAPSVPTPGESVSI	CRSNKSL	LHSMGNTYLY	40	
Модельное мышинное 1MJU_L	DI VMTQAAPSVPTPGESVSI	CRSNKSL	LHSMGNTYLY	40	
Акцепторное человека ABA71374	DI VMTQTPSLPVTTPGESASIS	CRSSQSL	RHYSGYTYIDW	40	
Акцепторное человека ABC66952	DI VMTQSPSLPVTTPGESASIS	CRSNQSL	LYSNGYNYLW	40	
Hu14G8VLv1	DI VMTQSPSLPVTTPGESVSI	CRSNKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu14G8VLv2	DI VMTQSPSLPVTTPGESASIS	CRSNKSL	LHSMGNTYLY	40	
Hu14G8VLv3	DI VMTQSPSLPVTTPGESASIS	CRSNKSL	LHSMGNTYLY	40	
	50	60	70	80	
m14G8VL	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTAFTLRI	80	
Модельное мышинное 1MJU_L	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTAFTLRI	80	
Акцепторное человека ABA71374	YLQKPGQSPQLLIYSGSNRAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Акцепторное человека ABC66952	YLQKPGQSPQLLIYSGSNRAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu14G8VLv1	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu14G8VLv2	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
Hu14G8VLv3	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDFSGSG	SGTDFTLKI	80	
	90	100	110		
m14G8VL	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GAGTKLEL	113	(SEQ ID NO.70)	
Модельное мышинное 1MJU_L	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GAGTKLEL	113	(SEQ ID NO.71)	
Акцепторное человека ABA71374	SRVEADVGVVYCMQALQVCSFTF	GGGCKLEIK	113	(SEQ ID NO.72)	
Акцепторное человека ABC66952	SRVEADVGVVYCMQALQSPYTF	GGGCKLEIK	113	(SEQ ID NO.73)	
Hu14G8VLv1	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	113	(SEQ ID NO.74)	
Hu14G8VLv2	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	113	(SEQ ID NO.75)	
Hu14G8VLv3	SRVEADVGVVYCMQHLEYPLTF	GGGCKLEIK	113	(SEQ ID NO.76)	

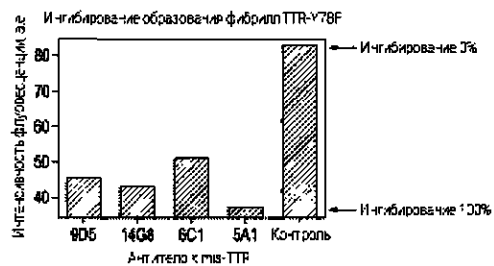
Фиг. 2B



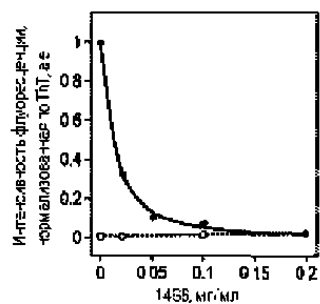
Фиг. 3А



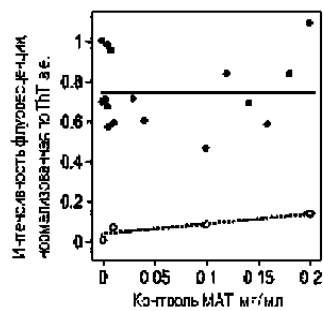
Фиг. 3В



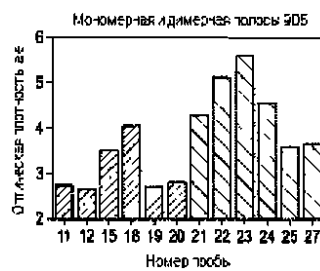
Фиг. 4А



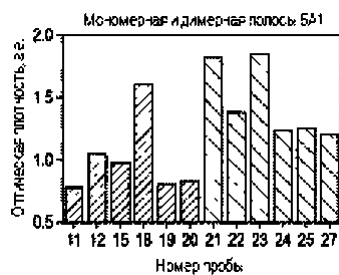
Фиг. 4В



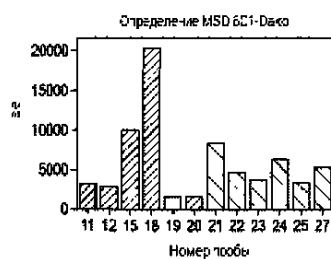
Фиг. 4С



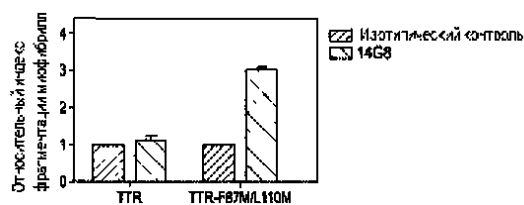
Фиг. 5А



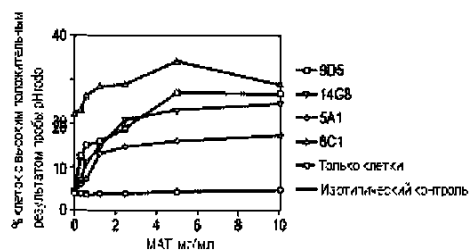
Фиг. 5В



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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