



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.31(22) Дата подачи заявки
2018.10.05(51) Int. Cl. A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТРАНСТИРЕТИНА

(31) 62/569,438; 62/579,817; 62/647,582

(32) 2017.10.06; 2017.10.31; 2018.03.23

(33) US

(86) PCT/US2018/054723

(87) WO 2019/071206 2019.04.11

(71) Заявитель:
ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС
ЛИМИТЕД (IE)

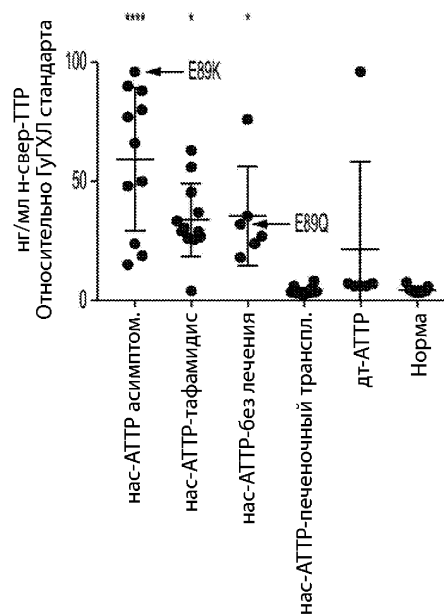
(72) Изобретатель:

Солменс Джошуа Реджинальд,
Александр Светлана, Барбур Робин,
Ли Цзяньминь, Хигаки Джеффри Н.,
Нидждар Тарлохан С. (US)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)

(57) Данное изобретение предлагает способы обнаружения транстиретина (ТТР) с использованием захватывающего антитела и репортерного антитела. Захватывающее антитело связывается преимущественно с неправильно свернутым ТТР по сравнению с нативной тетрамерной формой ТТР. Указанное захватывающее антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 89-97 ТТР или с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 101-109 ТТР. 9D5 и 18C5 представляют собой примеры подходящих захватывающих антител. Указанные способы могут быть использованы для диагностики заболеваний или нарушений, связанных с накоплением ТТР или накоплением отложений ТТР (например, амилоидоз ТТР), и для мониторинга эффективности терапий ТТР среди других применений.



СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТРАНСТИРЕТИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет согласно §119(e) раздела 35 Кодекса Законов США по предварительной заявке США № 62/569438, поданной 6 октября 2017 года, предварительной заявке США № 62/579817, поданной 31 октября 2017 года, и предварительной заявке США № 62/647582, поданной 23 марта 2018 года, каждая из которых включена посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Перечень последовательностей, записанный в файл 516713SEQLST.txt, имеет размер 61,8 килобайта, был создан 20 сентября 2018 года, и тем самым включен в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Считается, что некоторые заболевания вызваны аномальным сворачиванием и агрегацией болезнь-специфических белков. Эти белки могут скапливаться в виде патологических диагностических накоплений, известных как амилоиды, которые визуализируются некоторыми гистологическими красителями. Считается, что амилоиды вызывают воспалительные реакции и имеют множество негативных последствий для вовлеченных тканей. Кроме того, могут существовать и оказывать цитотоксическое действие меньшие агрегаты аномально свернутого белка.

[0004] Транстиретин (ТТР) является одним из многих белков, которые, как известно, могут неправильно сворачиваться и агрегироваться (например, подвергаются амилоидогенезу). Транстиретин-опосредованный амилоидоз (АТТР) включает в себя две формы заболевания: наследственное заболевание, возникающее из-за неправильного свертывания мутированного ТТР или варианта ТТР, а также спорадическое, негенетическое заболевание, вызванное неправильным свертыванием и агрегацией ТТР дикого типа. Процесс ТТР амилоидогенеза может вызвать патологию в нервной системе и/или сердце, а также в других тканях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения неправильно свернутого транстиретина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя: (а) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и

репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и (b) обнаружение репортерного антитела, которое формирует сэндвич-комплекс на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0006] В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР. В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, являющегося носителем мутации, выбранной из группы, состоящей из: V30M, Y114C, G47R, S50I, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q и V122I. В некоторых таких способах, мутацию выбирают из группы, состоящей из: V30M, Y114C и S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой V30M. В некоторых таких способах, мутация представляет собой Y114C. В некоторых таких способах, мутация представляет собой S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой E89K. В некоторых таких способах, мутация представляет собой E89Q.

[0007] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело. В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой 18C5, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант, или поликлональное анти-ТТР антитело.

[0008] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой 18C5, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой 8C3, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой 7G7, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0009] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой AD7F6, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой RT24, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой NI-301.35G11, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0010] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой

9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD101, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MDF102, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD103. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD 105, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD 107, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD 108, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD 109, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD111, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0011] В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой антитело, которое связывается в пределах остатков 101-109, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, или 115-127 TTP.

[0012] Некоторые такие способы обнаруживают неправильно свернутый TTP, включая замену E89K. Некоторые такие способы обнаруживают неправильно свернутый TTP, включая замену E89Q.

[0013] В некоторых таких способах, биологический образец представляет собой первую аликвоту собранного образца, и способ дополнительно включает в себя повторение стадии (а) и (b) с второй аликвотой собранного образца, дополнительно содержащей исследуемое антитело, которое конкурирует с захватывающим антителом за связывание с TTP, причем уменьшенное количество репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс при повторении стадий, обеспечивает выявление способности исследуемого антитела связываться с неправильно свернутым TTP.

[0014] В некоторых таких способах, исследуемое антитело представляет собой 14G8, или его химерную или гуманизированную форму, захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой поликлональное

анти-ТТР антитело. В некоторых таких способах, исследуемое антитело представляет собой гуманизованную форму 14G8.

[0015] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения *in vivo* связывания с целью исследуемого антитела, вводимого субъекту, целью которого является эпитоп в пределах остатков 89-97 неправильно свернутого транстиретина (н-свер-ТТР), путем обнаружения н-свер-ТТР, остающегося в биологическом образце из субъекта, леченного исследуемым антителом, причем способ включает в себя: (а) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом в ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и (b) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0016] В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР. В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, являющегося носителем мутации, выбранной из группы, состоящей из: V30M, Y114C, G47R, S50I, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q и V122I. В некоторых таких способах, мутацию выбирают из группы, состоящей из: V30M, Y114C и S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой V30M. В некоторых таких способах, мутация представляет собой Y114C. В некоторых таких способах, мутация представляет собой S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой E89K. В некоторых таких способах, мутация представляет собой E89Q.

[0017] В некоторых таких способах, уменьшение обнаружения неправильно свернутого ТТР у леченного субъекта по сравнению с обнаружением неправильно свернутого ТТР в биологическом образце из нелеченного субъекта коррелирует с положительным связыванием с целью и лечением субъекта тем же или меньшим количеством исследуемого антитела. В некоторых таких способах, леченный субъект и нелеченный субъект являются одним и тем же индивидом.

[0018] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5 и репортерное антитело представляет собой 9D5, причем захватывающее антитело и репортерное антитело имеют разные метки. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой 14G8. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а

репортерное антитело представляет собой 5A1. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 9D5, а репортерное антитело представляет собой 6C1. В некоторых таких способах, репортерное антитело конкурирует за связывание с захватывающим антителом за связывание мультимерного неправильно свернутого транстиретина.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, репортерное антитело имеет электрохемилюминесцентную метку и детектируется с помощью электрохемилюминесценции. В некоторых способах согласно данному изобретению, захватывающее антитело имеет биотиновую метку.

[0020] В варианте осуществления, способы выполняют путем качественной оценки. В варианте осуществления способы выполняют путем количественной оценки для выявления абсолютного или относительного количества неправильно свернутого ТТР.

[0021] В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе перед стадией приведения в контакт. В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяется к твердой фазе через линкер. В некоторых таких способах, твердая фаза содержит, по меньшей мере, один электрод.

[0022] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела с сигналом от репортерного антитела в контрольном образце, содержащем известное количество неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

[0023] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела из калибровочной кривой сигнала с количеством неправильно свернутого ТТР для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце. В некоторых таких способах, сигнал от репортерного антитела пропорционален количеству неправильно свернутого ТТР в образце.

[0024] В некоторых таких способах, образец представляет собой образец из человека. В некоторых таких способах, образец представляет собой жидкость организма. В некоторых таких способах, образец представляет собой плазму человека.

[0025] В одном варианте осуществления, наличие неправильно свернутого ТТР используется для постановки диагноза субъекту, из которого был получен образец, с транстиретин-опосредованным амилоидозом. В одном варианте осуществления, транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретин-опосредованный амилоидоз или спорадический транстиретин-опосредованный амилоидоз дикого типа. В одном варианте осуществления, субъект был идентифицирован как имеющий риск наследственного транстиретин-опосредованного амилоидоза на основании генетического

тестирования.

[0026] В одном варианте осуществления, у субъекта не проявляются симптомы наследственного транстиретинового амилоидоза. В одном варианте осуществления, субъект не имеет полиневропатии или кардиомиопатии.

[0027] В одном варианте осуществления, наследственный транстиретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).

[0028] В одном варианте осуществления, биологический образец получен от пациента, получающего лечение транстиретин-опосредованного амилоидоза.

[0029] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя сравнение количества неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта, ранее леченного от транстиретин-опосредованного амилоидоза, с количеством неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта до лечения или в течение более ранней стадии лечения; и (a) увеличение дозы или частоты введения предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР такое же или больше, чем ранее обнаруженное; или (b) уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное. В варианте осуществления, неправильно свернутый ТТР обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0030] В некоторых таких способах, предварительное лечение выполняют путем внутривенного введения анти-ТТР антитела, и если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное, предшествующее лечение прекращают, и заменяют лечением стабилизатором ТТР, терапией на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапии с РНК-интерференцией, или комбинированной терапией с доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор

тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0031] В некоторых таких способах, анти-ТТР антитело представляет собой 14G8. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0032] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя: (а) сравнение величины связывания репортерного антитела в образце из субъекта, до начала лечения транстиретин-опосредованного амилоидоза, с величиной связывания репортерного антитела, обнаруженного у субъекта после начала лечения; и (b) увеличение дозы или частоты введения лечения, если величина связывания репортерного антитела такая же или больше, чем ранее обнаруженная; или (с) уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение препарата, если величина связывания репортерного антитела меньше, чем ранее обнаруженная. В варианте осуществления, связывание репортерного антитела обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0033] В некоторых способах, транстиретин-опосредованный амилоидоз отличают от амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ). В некоторых способах, образец взят из трансгенной мыши с трансгеном, экспрессирующим ТТР человека.

[0034] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ

определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстиретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце; включающий в себя:

- a) разделение биологического образца на две части;
- b) обнаружение совокупного неправильно свернутого ТТР в первой части биологического образца путем
 - i) приведения в контакт первой части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и
 - ii) обнаружение репортерного антитела, формирующее сэндвич-комплекс на стадии (b)(i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР;
- c) обнаружение совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР во второй части биологического образца путем
 - i) приведения в контакт второй части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и
 - ii) обнаружение репортерного антитела, формирующее сэндвич-комплекс на стадии (c)(i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР;
- d) вычисление соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР из (c) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР из (b).

[0035] В одном аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения неправильно свернутого транстиретина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее

антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0036] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело. В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI- 301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD 114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0037] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 9D5, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 14G8, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 5A1, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 6C1, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 8C3, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 7G7, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0038] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой AD7F6, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой RT24, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой NI-301.35G11, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0039] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD101, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело

представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MDF102, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD103, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 105, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 107, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 108, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 109, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD111, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0040] В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой антитело, которое связывается в пределах остатков 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100- 127, 110-127, или 115-127 ТТР.

[0041] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения мультимерного неправильно свернутого транстиретина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с мультимерным неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР.

[0042] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5 и репортерное антитело представляет собой 18C5, причем захватывающее антитело и репортерное антитело имеют разные метки. В некоторых таких способах, репортерное

антитело конкурирует за связывание с захватывающим антителом за связывание мультимерного неправильно свернутого транстиретина.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, репортерное антитело имеет электрохемилюминесцентную метку и детектируется с помощью электрохемилюминесценции. В некоторых способах согласно данному изобретению, захватывающее антитело имеет биотиновую метку.

[0044] В варианте осуществления, способы выполняют путем качественной оценки. В варианте осуществления способы выполняют путем количественной оценки для выявления абсолютного или относительного количества неправильно свернутого ТТР.

[0045] В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе перед стадией приведения в контакт. В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяется к твердой фазе через линкер. В некоторых таких способах, твердая фаза содержит, по меньшей мере, один электрод.

[0046] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела с сигналом от репортерного антитела в контрольном образце, содержащем известное количество неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

[0047] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела из калибровочной кривой сигнала с количеством неправильно свернутого ТТР для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце. В некоторых таких способах, сигнал от репортерного антитела пропорционален количеству неправильно свернутого ТТР в образце.

[0048] В некоторых таких способах, образец взят из человека. В некоторых таких способах, образец представляет собой жидкость организма. В некоторых таких способах, образец представляет собой плазму человека.

[0049] В варианте осуществления, наличие неправильно свернутого ТТР используется для постановки диагноза субъекту, из которого был получен образец, с транстиретин-опосредованным амилоидозом. В одном варианте осуществления, транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз дикого типа. В одном варианте осуществления, субъект был идентифицирован как имеющий риск наследственного транстиретинового амилоидоза на основании генетического тестирования.

[0050] В одном варианте осуществления, у субъекта не проявляются симптомы наследственного транстиретинового амилоидоза. В одном варианте осуществления,

субъект не имеет полиневропатии или кардиомиопатии.

[0051] В одном варианте осуществления, наследственный транстиретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).

[0052] В одном варианте осуществления, биологический образец получен от пациента, получающего лечение транстиретин-опосредованного амилоидоза.

[0053] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя сравнение количества неправильно свернутого ТТР в образце из субъекта, ранее леченного от транстиретин-опосредованного амилоидоза, с количеством неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта до лечения или в течение более ранней стадии лечения; и увеличение дозы или частоты введения предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР такое же или больше, чем ранее обнаруженное; или уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное. В варианте осуществления, неправильно свернутый ТТР обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0054] В некоторых таких способах, предварительное лечение выполняют путем внутривенного введения анти-ТТР антитела, и если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное, предшествующее лечение прекращают, и заменяют лечением стабилизатором ТТР, терапией на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапии с РНК-интерференцией, или комбинированной терапией с доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой

инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0055] В некоторых таких способах, анти-ТТР антитело представляет собой 14G8. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0056] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя: (а) сравнение величины связывания репортерного антитела в образце из субъекта, до начала лечения транстиретин-опосредованного амилоидоза, с величиной связывания репортерного антитела, обнаруженного у субъекта после начала лечения; и (b) увеличение дозы или частоты введения лечения, если величина связывания репортерного антитела такая же или больше, чем ранее обнаруженная; или (с) уменьшение дозы или частоты введения лечения, или прекращение лечения, если величина связывания репортерного антитела меньше, чем ранее обнаруженная. В варианте осуществления, связывание репортерного антитела обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0057] В некоторых способах, транстиретин-опосредованный амилоидоз отличают от амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ). В некоторых способах, образец берут из трансгенной мыши с трансгеном, экспрессирующим ТТР человека.

[0058] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстиретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце; включающий в себя:

a) разделение биологического образца на две части;
b) обнаружение совокупного неправильно свернутого ТТР в первой части биологического образца путем

i) приведения в контакт первой части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с неправильно свернутым ТТР на стадии (i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР;

c) обнаружение совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР во второй части биологического образца путем

i) приведения в контакт второй части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с мультимерным неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР.

d) вычисление соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР из (c) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР из (b).

[0059] В одном аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения неправильно свернутого транстиретина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0060] В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР. В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, являющегося носителем мутации, выбранной из группы, состоящей из: V30M, Y114C и S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой V30M. В некоторых таких способах, мутация представляет собой Y114C. В некоторых таких способах, мутация представляет собой S50I.

[0061] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело. В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI- 301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD 114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0062] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 9D5, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 14G8, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 5A1, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 6C1, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 8C3, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой 7G7, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0063] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой AD7F6, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой RT24, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой NI-301.35G11, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0064] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой

18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD101, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MDF102, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD103, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 105, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 107, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 108, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD 109, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD111, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, а репортерное антитело представляет собой MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

[0065] В некоторых таких способах, репортерное антитело представляет собой антитело, которое связывается в пределах остатков 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, или 115-127 ТТР.

[0066] В одном аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения *in vivo* связывания с целью исследуемого антитела, вводимого субъекту, целью которого является эпитоп в пределах остатков 101-109 неправильно свернутого транстиретина (н-свер-ТТР), путем обнаружения н-свер-ТТР, остающегося в биологическом образце из субъекта, леченного исследуемым антителом, причем способ включает в себя: (а) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в ТТР, отличающимся от такового захватывающего антитела; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и (b) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (а), если

таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0067] В некоторых таких способах, биологический образец берут из пациента с наследственным АТТР. В некоторых таких способах, биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, являющегося носителем мутации, выбранной из группы, состоящей из: V30M, Y114C и S50I. В некоторых таких способах, мутация представляет собой V30M. В некоторых таких способах, мутация представляет собой Y114C. В некоторых таких способах, мутация представляет собой S50I.

[0068] В некоторых таких способах, захватывающее антитело представляет собой 18C5, причем захватывающее антитело и репортерное антитело имеют разные метки. В некоторых таких способах, репортерное антитело конкурирует за связывание с захватывающим антителом за связывание мультимерного неправильно свернутого транстиретина.

[0069] В некоторых вариантах осуществления, репортерное антитело имеет электрохемилюминесцентную метку и детектируется с помощью электрохемилюминесценции. В некоторых способах согласно данному изобретению, захватывающее антитело имеет биотиновую метку.

[0070] В варианте осуществления, способы выполняют путем качественной оценки. В варианте осуществления способы выполняют путем количественной оценки для выявления абсолютного или относительного количества неправильно свернутого ТТР.

[0071] В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе перед стадией приведения в контакт. В некоторых таких способах, захватывающее антитело присоединяется к твердой фазе через линкер. В некоторых таких способах, твердая фаза содержит, по меньшей мере, один электрод.

[0072] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела с сигналом от репортерного антитела в контрольном образце, содержащем известное количество неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

[0073] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение сигнала от репортерного антитела из калибровочной кривой сигнала с количеством неправильно свернутого ТТР для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце. В некоторых таких способах, сигнал от репортерного антитела пропорционален количеству неправильно свернутого ТТР в образце.

[0074] В некоторых таких способах, образец взят из человека. В некоторых таких способах, образец представляет собой жидкость организма. В некоторых таких способах,

образец представляет собой плазму человека.

[0075] В варианте осуществления, наличие неправильно свернутого ТТР используется для постановки диагноза субъекту, из которого был получен образец, с транстретин-опосредованным амилоидозом. В одном варианте осуществления, транстретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстретиновый амилоидоз или спорадический транстретиновый амилоидоз дикого типа. В одном варианте осуществления, субъект был идентифицирован как имеющий риск наследственного транстретинового амилоидоза на основании генетического тестирования.

[0076] В одном варианте осуществления, у субъекта не проявляются симптомы наследственного транстретинового амилоидоза. В одном варианте осуществления, субъект не имеет полиневропатии или кардиомиопатии.

[0077] В одном варианте осуществления, наследственный транстретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).

[0078] В одном варианте осуществления, биологический образец получен от пациента, получающего лечение транстретин-опосредованного амилоидоза.

[0079] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя сравнение количества неправильно свернутого ТТР в образце из субъекта, ранее леченного от транстретин-опосредованного амилоидоза, с количеством неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта до лечения или в течение более ранней стадии лечения; и увеличение дозы или частоты введения предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР такое же или больше, чем ранее обнаруженное; или уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное. В варианте осуществления, неправильно свернутый ТТР обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой

присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0080] В некоторых таких способах, предварительное лечение выполняют путем внутривенного введения анти-ТТР антитела, и если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное, предшествующее лечение прекращают, и заменяют лечением стабилизатором ТТР, терапией на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапии с РНК-интерференцией, или комбинированной терапией с доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0081] В некоторых таких способах, анти-ТТР антитело представляет собой 14G8. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или дифлунизал. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен. В некоторых таких способах, терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

[0082] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ корректировки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя сравнение величины связывания репортерного антитела, обнаруженного с помощью способа по п. 46, в образце из субъекта, до начала лечения транстиретин-опосредованного амилоидоза, с величиной связывания репортерного антитела, обнаруженного у субъекта после начала лечения; и увеличение дозы или частоты введения лечения, если величина связывания репортерного антитела такая же или больше, чем ранее обнаруженная; или уменьшение дозы или частоты введения лечения, или прекращение лечения, если величина связывания репортерного антитела меньше, чем ранее обнаруженная. В варианте осуществления, неправильно свернутый ТТР обнаруживают способом, включающим в себя приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце,

захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

[0083] В некоторых способах, транстретин-опосредованный амилоидоз отличают от амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ). В некоторых способах, образец берут из трансгенной мыши с трансгеном, экспрессирующим ТТР человека.

[0084] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце; включающий в себя:

- a) разделение биологического образца на две части;
- b) обнаружение совокупного неправильно свернутого ТТР в первой части биологического образца путем
 - i) приведения в контакт первой части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и
 - ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с неправильно свернутым ТТР на стадии (i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР;
- d) обнаружение совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР во второй части биологического образца путем
 - i) приведения в контакт второй части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и
 - ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с мультимерным неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР.

е) вычисление соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР из (с) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР из (b).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0085] Фиг. 1 иллюстрирует результаты сэндвич-иммуноанализа с использованием платформы электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD), показывающие, что 9D5 обнаруживает повышенный неправильно свернутый ТТР в образцах плазмы из пациентов с транстретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не подвергались трансплантации печени, в анализе с использованием поликлонального анти-ТТР репортерного антитела.

[0086] Фиг. 2 иллюстрирует результаты *ex vivo* анализа связывания с целью с использованием захватывающего антитела 9D5 и поликлонального анти-ТТР репортерного антитела, показывающие, что m14G8 снижает уровни свободного неправильно свернутого ТТР при внесении в плазму пациента.

[0087] Фиг. 3 иллюстрирует результаты сэндвич-иммуноанализа с использованием платформы электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD), показывающие, что 9D5 обнаруживает повышенный неправильно свернутый ТТР в образцах плазмы из пациентов с транстретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не подвергались трансплантации печени, в анализе с использованием репортерного антитела 18C5.

[0088] Фиг. 4 иллюстрирует результаты эксперимента с использованием вестерн-блоттинга, показывающие, что 18C5 обладает высокой реакционной способностью в отношении денатурированного мономера ТТР, незначительной реакционной способностью в отношении денатурированного димера, и очень слабой реакционной способностью в отношении нативных частиц ТТР.

[0089] Фиг. 5 иллюстрирует результаты эксперимента с использованием вестерн-блоттинга, показывающие, что коммерческое антитело ТТР не может различить нативный и денатурированный ТТР, и показывает очень высокую реакционную способность в отношении мономерного, а также димерного нативного и денатурированного ТТР.

[0090] Фиг. 6 иллюстрирует результаты сэндвич-иммуноанализа с использованием платформы электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD), показывающие, что 18C5 обнаруживает повышенный неправильно свернутый ТТР в образцах плазмы из пациентов с транстретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не

подвергались трансплантации печени.

[0091] Фиг. 7 иллюстрирует результаты сэндвич-иммуноанализа с использованием платформы электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD), показывающие, что 18C5 обнаруживает повышенный мультимерный неправильно свернутый ТТР в образцах плазмы из пациентов с транстретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не подвергались трансплантации печени.

[0092] Фиг. 8 иллюстрирует результаты эксперимента с использованием вестерн-блоттинга, показывающие, что 9D5 обнаруживает повышенные уровни н-свер-ТТР (неправильно свернутых ТТР мономеров и олигомеров) в плазме из пациентов с наследственным АТТР.

[0093] Фиг. 9 иллюстрирует диаграмму фармакодинамического анализа для измерения связывания мАт н-свер-ТТР (m14G8) с н-свер-ТТР плазмы (связывание с целью).

[0094] Фиг. 10 иллюстрирует результаты сэндвич-иммуноанализа с использованием платформы электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD), показывающие, что 9D5 обнаруживает повышенный неправильно свернутый ТТР в образцах плазмы из пациентов с транстретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не подвергались трансплантации печени, в анализе с использованием поликлонального анти-ТТР репортерного антитела.

[0095] Фиг. 11 иллюстрирует выравнивание переменных областей тяжелой цепи мышинового антитела 18C5 (SEQ ID NO: 81), последовательности IGHV3-48*01 зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 84), акцептора 5VZY-VH_huFrwk человека (Crenefab-VH) (SEQ ID NO: 83) и гуманизированных вариантов антитела 18C5 (гум18C5_VH-v1 и гум18C5_VH-v2, SEQ ID NO: 84 и 85, соответственно). CDR, определенные в соответствии с совмещенной нумерацией Кабата/Чотиа, выделены жирным шрифтом в последовательности переменной области тяжелой цепи 18C5 мыши.

[0096] Фиг. 12 иллюстрирует выравнивание переменных областей легкой цепи мышинового антитела 18C5 (SEQ ID NO: 87), последовательности IGKV2-30*02 зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 90), акцептора 5VZY-VL_huFrwk человека (Crenefab-VL) (SEQ ID NO: 89) и гуманизированных вариантов антитела 18C5 (гум18C5-VL-v1 и гум18C5-VL-v2, SEQ ID NO: 91 и 92, соответственно). CDR, определенные в соответствии со совмещенной Кабата/Чотиа, выделены жирным шрифтом в последовательности переменной области легкой цепи 18C5 мыши.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0097] SEQ ID NO: 1 представляет аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0098] SEQ ID NO: 2 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0099] SEQ ID NO: 3 представляет аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0100] SEQ ID NO: 4 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0101] SEQ ID NO: 5 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0102] SEQ ID NO: 6 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-H1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0103] SEQ ID NO: 7 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0104] SEQ ID NO: 8 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-H2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0105] SEQ ID NO: 9 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0106] SEQ ID NO: 10 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-H3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0107] SEQ ID NO: 11 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0108] SEQ ID NO: 12 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0109] SEQ ID NO: 13 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0110] SEQ ID NO: 14 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0111] SEQ ID NO: 15 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0112] SEQ ID NO: 16 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной Кабата/Чотиа.

[0113] SEQ ID NO: 17 представляет аминокислотную последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18C5 (IgG1 человека).

[0114] SEQ ID NO: 18 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18C5 (IgG1 человека).

[0115] SEQ ID NO: 19 представляет аминокислотную последовательность химерной константной области легкой цепи 18C5 (каппа человека).

[0116] SEQ ID NO: 20 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность химерной константной области легкой цепи 18C5 (каппа человека).

[0117] SEQ ID NO: 21 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1.

[0118] SEQ ID NO: 22 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0119] SEQ ID NO: 23 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0120] SEQ ID NO: 24 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи с N-концевым аргинином.

[0121] SEQ ID NO: 25 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина.

[0122] SEQ ID NO: 26 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную по номером доступа P02766.1 (UniProt).

[0123] SEQ ID NO: 27 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную по номером доступа AAB35639.1 (GenBank).

[0124] SEQ ID NO: 28 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную по номером доступа AAB35640.1 (GenBank).

[0125] SEQ ID NO: 29 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную по номером доступа ABI63351.1 (GenBank).

[0126] SEQ ID NO: 30 представляет аминокислотную последовательность остатков 101-109 транстиретина человека.

[0127] SEQ ID NO: 31 представляет аминокислотную последовательность остатков 87-127 транстиретина человека.

[0128] SEQ ID NO: 32 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0129] SEQ ID NO: 33 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область легкой цепи с C-концевым аргинином.

[0130] SEQ ID NO: 34 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область легкой цепи без C-концевого аргинина.

[0131] SEQ ID NO: 35 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида константной области тяжелой цепи.

[0132] SEQ ID NO: 36 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид константной области тяжелой цепи.

[0133] SEQ ID NO: 37 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида константной области легкой цепи.

[0134] SEQ ID NO: 38 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид константной области тяжелой цепи.

[0135] SEQ ID NO: 39 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 14G8.

[0136] SEQ ID NO: 40 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 14G8.

[0137] SEQ ID NO: 41 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 14G8.

[0138] SEQ ID NO: 42 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 14G8.

[0139] SEQ ID NO: 43 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 14G8.

[0140] SEQ ID NO: 44 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 14G8.

[0141] SEQ ID NO: 45 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антитела 5 A1.

[0142] SEQ ID NO: 46 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 5A1.

[0143] SEQ ID NO: 47 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 5A1.

[0144] SEQ ID NO: 48 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 5A1.

[0145] SEQ ID NO: 49 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 5A1.

[0146] SEQ ID NO: 50 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 5A1.

[0147] SEQ ID NO: 51 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 5A1.

[0148] SEQ ID NO: 52 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1

по Кабату антитела 6C1.

[0149] SEQ ID NO: 53 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 6C1.

[0150] SEQ ID NO: 54 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 6C1.

[0151] SEQ ID NO: 55 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 6C1.

[0152] SEQ ID NO: 56 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 6C1.

[0153] SEQ ID NO: 57 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 6C1.

[0154] SEQ ID NO: 58 представляет аминокислотную последовательность области VH антитела AD7F6.

[0155] SEQ ID NO: 59 представляет аминокислотную последовательность области VL антитела AD7F6.

[0156] SEQ ID NO: 60 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела RT24.

[0157] SEQ ID NO: 61 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела RT24.

[0158] SEQ ID NO: 62 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела RT24.

[0159] SEQ ID NO: 63 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела RT24.

[0160] SEQ ID NO: 64 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела RT24.

[0161] SEQ ID NO: 65 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела RT24.

[0162] SEQ ID NO: 66 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела NI-301.35G11.

[0163] SEQ ID NO: 67 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела NI-301.35G11.

[0164] SEQ ID NO: 68 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела NI-301.35G11.

[0165] SEQ ID NO: 69 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела NI-301.35G11.

[0166] SEQ ID NO: 70 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела NI-301.35G11.

[0167] SEQ ID NO: 71 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела NI-301.35G11.

[0168] SEQ ID NO: 72 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антител MFD101, MFD102, MFD103, MFD105.

[0169] SEQ ID NO: 73 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антител MFD107, MFD 108, MFD109, MFD111.

[0170] SEQ ID NO: 74 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антитела MFD114.

[0171] SEQ ID NO: 75 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 9D5.

[0172] SEQ ID NO: 76 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 9D5.

[0173] SEQ ID NO: 77 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 9D5.

[0174] SEQ ID NO: 78 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 9D5.

[0175] SEQ ID NO: 79 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 9D5.

[0176] SEQ ID NO: 80 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 9D5.

[0177] SEQ ID NO: 81 представляет аминокислотную последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи антитела 18C5 мыши.

[0178] SEQ ID NO: 82 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела Fab антипироглутамат-Абета с#17 мыши, номер доступа GenBank № 1212215935.

[0179] SEQ ID NO: 83 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного Fab Crenezumab (CreneFab) PDB: 5VZY, номер доступа GenBank № 1229749875.

[0180] SEQ ID NO: 84 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи последовательности IGHV3-48*01 зародышевой линии человека, номер доступа GenBank № 1FN550289.1.

[0181] SEQ ID NO: 85 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VH_1.

[0182] SEQ ID NO: 86 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VH_2.

[0183] SEQ ID NO: 87 представляет аминокислотную последовательность зрелой варибельной области легкой цепи антитела 18C5 мыши.

[0184] SEQ ID NO: 88 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи антитела Fab антипироглутамат-Абета с#17 мыши, номер доступа GenBank № 1212215934.

[0185] SEQ ID NO: 89 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного Fab Crenezumab (CreneFab) PDB: 5VZY, номер доступа GenBank № 1229749876.

[0186] SEQ ID NO: 90 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи последовательности зародышевой линии IGKV2-30*2 человека, номер доступа GenBank № CAA77315.

[0187] SEQ ID NO: 91 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL_1.

[0188] SEQ ID NO: 92 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL_2.

[0189] SEQ ID NO: 93 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 18C5 мыши.

[0190] SEQ ID NO: 94 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Чотиа антитела 18C5 мыши.

[0191] SEQ ID NO: 95 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-H1 антитела 18C5 мыши.

[0192] SEQ ID NO: 96 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Чотиа антитела 18C5 мыши.

[0193] SEQ ID NO: 97 представляет аминокислотную последовательность АтМ CDR-H2 антитела 18C5 мыши.

[0194] SEQ ID NO: 98 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-H2 антитела 18C5 мыши.

[0195] SEQ ID NO: 99 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-H3 антитела 18C5 мыши.

[0196] SEQ ID NO: 100 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L1 антитела 18C5 мыши.

[0197] SEQ ID NO: 101 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L2 антитела 18C5 мыши.

[0198] SEQ ID NO: 102 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L3 антитела 18C5 мыши.

[0199] SEQ ID NO: 103 представляет аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 9D5 мыши.

[0200] SEQ ID NO: 104 представляет аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи антитела 9D5 мыши.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0201] 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 препятствующих 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 носителя, предназначенного для облегчения его применения. Иногда моноклональные антитела являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас. чистыми от препятствующих 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.

[0202] 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.

[0203] 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 варибельную 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.

[0204] 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 больше аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область «D», включающая около 10 или больше аминокислот. Смотрите в целом, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (включен в полном объеме посредством ссылки для всех целей).

[0205] Переменная область легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (также называемая в данном документе «переменный домен легкой цепи» («домен VL») или «переменный 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.

[0206] Обозначение аминокислот для каждого домена VL и VH соответствует любому обычному определению CDR. Обычные определения включают в себя определение по Кабату (*Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991), определение по Чотиа (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342: 878-883, 1989); совмещенное определение для CDR по Чотиа-Кабату, в котором CDR-H1 является совмещенными CDR по Чотиа и Кабату; определение AtM, используемое программным обеспечением для моделирования антител Oxford Molecular; и определение контакта по Мартину и соавт. (bioinfo.org.uk/abs) (см. Таблицу 1). Кабат предлагает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация по Кабату), в котором соответствующим остаткам между

различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковое число. Когда указывается, что антитело содержит CDR по некоторым определением CDR (например, Кабату), это определение указывает минимальное количество остатков CDR, присутствующих в антителе (т. е. CDR по Кабату). Это не исключает того, что также присутствуют другие остатки, попадающие в другое общепринятое определение CDR, но они находятся вне указанного определения. Например, антитело, содержащее CDR, определенные по Кабату, включает среди других вариантов, антитело, в котором CDR содержат остатки CDR по Кабату и не содержат других остатков CDR, и антитело, в котором CDR H1 представляет собой составной CDR H1 по Чотиа-Кабату и другие CDR содержат остатки CDR по Кабату, и никаких дополнительных остатков CDR на основе других определений.

Таблица 1

Общепринятые определения CDR с использованием нумерации по Кабату

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

*CDR-H1 по Чотиа может заканчиваться на H32, H33 или H34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату размещают вставки дополнительных остатков в 35А и 35В, тогда как в нумерации по Чотиа их размещают в 31А и 31 В. Если не представлено ни H35А, ни H35В (нумерация по Кабату), петля CDR-H1 по Чотиа заканчивается на H32. Если есть только H35А, она заканчивается на H33. Если присутствуют и H35А и H35В, она заканчивается на H34.

[0207] 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 гуманизованное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (см., например, 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 гуманизованного 9D5 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстретине, чем тот, что связан антителом 9D5. В некоторых биспецифических антителах две различные пары тяжелых/легких цепей включают пару тяжелая цепь/легкая цепь гуманизованного 18C5 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстретине, чем тот, что связан антителом 18C5.

[0208] В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизованное антитело 9D5 или гуманизованное антитело 18C5, как дополнительно описано ниже, а другая пара тяжелая цепь/легкая цепь из антитела, которое связывается с рецептором, экспрессируемым на гематоэнцефалическом барьере, таким как рецептор инсулина, рецептор инсулин-подобного фактора (IGF - insulin-like growth factor) роста, рецептор лептина или рецептор липопротеинов или рецептор трансферрина (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). Такое биспецифическое антитело может быть перенесено через гематоэнцефалический барьер посредством рецептор-опосредованного трансцитоза. Поглощение мозгом биспецифического антитела может быть дополнительно усилено путем проектирования биспецифического антитела для снижения его аффинности к рецептору гематоэнцефалического барьера. Сниженная аффинность к рецептору приводит к более широкому распространению в мозге (см., например, Atwal *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

[0209] Примерами биспецифических антител также могут быть: 1) антитело с двойным переменным доменом (DVD-IgTM), 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 мультвалентной молекулы; 4) так называемая молекула «dock and lock», созданная на основе «домена димеризации и докинга» протеинкиназы А, применение которого с Fab приводит к получению биспецифического трехвалентного связывающего белка, состоящего из двух идентичных Fab-фрагментов, присоединённых к другому Fab-фрагменту; (5) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, слитых с обоими концам 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).

[0210] 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 в себя 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, из 2-5, 3-5, 3-9 или 5-9 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 26, включая, например, две или большее количество смежных аминокислот в пределах остатков 89-97 зрелой области SEQ ID NO: 26. Эпитоп также может быть конформационным эпитопом, содержащим, например, два или большее количество несмежных сегментов аминокислот в пределах остатков 89-97 зрелой области SEQ ID NO: 26. Если говорят, что антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот 89-97 транстиретина (ТТР) (зрелая область SEQ ID NO: 26), 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 ТТР может состоять из

аминокислот 89-97, 89-96, 90-97, 89-95, 90-96, 91-97, 89-94, 90-95, 91-96, 92-97, 89-93, 90-94, 91-95, 92-96, 93-97, 89-92, 90-93, 91-94, 92-95, 93-96, 94-97, 89-91, 90-92, 91-93, 92-94, 93-95, 94-96, 95-97 или SEQ ID NO:26, среди других линейных сегментов SEQ ID NO: 45, или в случае конформационных эпитопов, несмежных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 45. Эпитопы могут включать в себя замены E89K и E89Q, где E обозначает остаток дикого типа. Эпитоп может быть линейным, таким как эпитоп, например, из 2-5, 3-5, 3-9 или 5-9 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 26, включая, например, две или большее количество смежных аминокислот в пределах остатков 101-109 зрелой области SEQ ID NO: 26. Эпитоп также может быть конформационным эпитопом, содержащим, например, два или большее количество несмежных сегментов аминокислот в пределах остатков 101-109 зрелой области SEQ ID NO: 26. Если говорят, что антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислот 101-109 транстиретина (ТТР) (зрелая область SEQ ID NO: 26), 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 с аминокислотными остатками 101-109 ТТР может состоять из аминокислот 101-109, 101-108, 102-109, 101-107, 102-108, 103-109, 101-106, 102-107, 103-108, 104-109, 101-105, 102-106, 103-107, 104-108, 105-109, 101-104, 102-105, 103-106, 104-107, 105-108, 106-109, 101-103, 102-104, 103-105, 104-106, 105-107, 106-108, 107-109, 101-102, 102-103, 103-104, 104-105, 105-106, 106-107, 107-108 или SEQ ID NO: 26, среди других линейных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 30, или в случае конформационных эпитопов, несмежных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 30.

[0211] 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

[0212] Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором исследуемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с

общим антигеном (смотрите, например, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Исследуемое антитело конкурирует с контрольным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание контрольного антитела по меньшей мере на 50%, как измерено при анализе конкурентного связывания. Некоторые исследуемые антитела ингибируют связывание контрольных антител по меньшей мере на 75%, 90% или 99%. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела), включают в себя антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и контрольное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, находящимся достаточно проксимально по отношению к эпитопу, связанному контрольным антителом для создания стерического ограничения.

[0213] Термин «нативный» по отношению к структуре транстиретина (ТТР) относится к нормально свернутой структуре ТТР в его правильно функционирующем состоянии (т. е. тетрамер ТТР). Поскольку ТТР является тетрамером в его изначально свернутой форме, неродные формы ТТР включают, например, неправильно свернутые тетрамеры ТТР, мономеры ТТР, агрегированные формы ТТР, и ТТР в форме фибрилл. Неродные формы ТТР могут включать молекулы, содержащие аминокислотные последовательности ТТР дикого типа или мутации.

[0214] Термин «неправильно свернутый» по отношению к ТТР относится к вторичной и третичной структуре полипептидного мономера или мультимера ТТР и указывает на то, что полипептид принял конформацию, которая не является нормальной для этого белка в его правильно функционирующем состоянии. Хотя неправильное свертывание ТТР может быть вызвано с мутациями в белке (например, делецией, заменой или добавлением), белки ТТР дикого типа также могут быть неправильно свернуты при заболеваниях, экспонируя специфические эпитопы.

[0215] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, эксципиент или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами состава и не являются по существу вредным для его реципиента.

[0216] Термин «пациент» включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0217] 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.

[0218] 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. Полученный 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.

[0219] Термин «контрольный образец» относится к биологическому образцу, для которого не известно или не подозревается содержание мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм транстиретина (ТТР), например, таких как в амилоидные отложения ТТР. Контрольные образцы могут быть получены у лиц, не страдающих ТТР амилоидозом или специфически выбранным типом амилоидоза ТТР. Альтернативно, контрольные образцы могут быть получены у пациентов, страдающих ТТР амилоидозом или специфически выбранным типом амилоидоза ТТР. Такие образцы могут быть получены в то же время, что и биологический образец, который, как считается, содержит ТТР 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 ТТР амилоида, так и окружающие нормальные ткани). Предпочтительно контрольные образцы состоят в основном или полностью из ткани, свободной от амилоидных отложений ТТР, и могут быть использованы для сравнения с биологическим образцом, который, как считается, содержит амилоидные отложения ТТР. Предпочтительно ткань в контрольном образце имеет тот же самый тип, что и ткань в биологическом образце (например, кардиомиоциты в сердце).

[0220] Термин «болезнь» относится к любому аномальному состоянию, которое ухудшает физиологическую функцию. Этот термин широко используется для охвата любого нарушения, заболевания, аномалии, патологии, недуга, состояния или синдрома, при которых нарушается физиологическая функция, независимо от характера этиологии.

[0221] Термин «симптом» относится к субъективным свидетельствам заболевания, таким как измененная походка, как это воспринимается субъектом. «Признак» относится к объективным свидетельствам болезни, наблюдаемым врачом.

[0222] 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): asn, gln, cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): 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.

[0223] Идентичность последовательности в процентах определяется с помощью последовательностей антител, максимально выравненных согласно соглашению нумерации по Кабату. После выравнивания, если область антитела субъекта (например, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с той же областью контрольного антитела, то идентичность последовательности в процентах между областями субъекта и контрольного антитела представляет собой число позиций, занятых такой же аминокислотой как в области субъекта, так и в области контрольного антитела, разделенное на общее количество выровненных позиций двух областей, причем промежутки не учитываются, умноженное на 100 для преобразования в процентное соотношение.

[0224] 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.

[0225] Обозначение диапазона значений включает все целые числа в пределах диапазона или задающие диапазон, и все поддиапазоны, заданные целыми числами в пределах диапазона.

[0226] Если иное не вытекает из контекста, термин «около» охватывает значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, SEM) указанного значения.

[0227] Статистическая значимость означает $p \leq 0,05$.

[0228] Антитела согласно данному изобретению могут быть введены одновременно с другим лечением по тому же показанию, что и антитело, что означает, что другое лечение вводят, по меньшей мере, один раз в течение периода, в течение которого вводят антитело, такого периода, который начинается за один месяц до первого введения и заканчивается через месяц после последнего введения дозы антитела. Другое лечение может вводиться с повторяющимися интервалами в течение данного периода, которые могут совпадать или не совпадать с интервалами введения антитела. Другое лечение может быть симптоматическим лечением.

[0229] Лечение является симптоматическим, если оно затрагивает только один или

несколько симптомов заболевания, а не его причину, то есть его этиологию.

[0230] Формы существительных в единственном числе включают в себя 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

[0231] Согласно данному изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с остатками 89-97 или 101-109 транстиретина (ТТР). Некоторые антитела обладают способностью связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами ТТР. Некоторые антитела связываются с одной или обеими, мономерной или неправильно свернутой формами ТТР, предпочтительно по сравнению с нативной тетрамерной формой ТТР. Антитела могут быть использованы для лечения, или осуществления профилактики заболеваний или нарушений, связанных с накоплением ТТР или накоплением отложений ТТР (например, амилоидоза ТТР). Антитела также могут быть использованы для диагностики амилоидоза ТТР и ингибирования, или уменьшения агрегации ТТР. Антитела также могут быть использованы для демонстрации фармакодинамических эффектов терапии транстиретин-опосредованного амилоидоза, среди других применений. Преимущественное связывание означает константу соединения по меньшей мере в пять раз выше для любой или всех мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм ТТР, чем для нативной тетрамерной формы ТТР. Необязательно, константа соединения, по меньшей мере, в десять раз выше для любой или всех мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм ТТР, чем для нативной тетрамерной формы ТТР. Необязательно, антитело, такое как, например, 9D5 или 18C5, не обладает специфическим связыванием с нативной тетрамерной формой ТТР.

II. Целевые молекулы

[0232] Транстиретин (ТТР) представляет собой сывороточный белок и транспортный белок спинномозговой жидкости, имеет длину 127 аминокислот, массу 55 кДа и синтезируется в основном печени. Он также упоминается как преальбумин, тироксинсвязывающий преальбумин, АТТР и ТВРА (thyroxine-binding prealbumin - тироксин-связывающий преальбумин). В своем нативном состоянии ТТР существует как тетрамер. У гомозигот тетрамеры содержат идентичные 127-аминокислотные субъединицы, богатые на бета-слои. У гетерозигот тетрамеры ТТР состоят из различных субъединиц и/или субъединиц дикого типа, которые обычно объединяются статистическим

способом.

[0233] Установленная функция ТТР в крови заключается в транспорте *holo*-ретинолсвязывающего белка. Хотя ТТР является основным переносчиком тироксина (Т₄) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам, используемым для *holo*-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания Т₄ фактически незаняты у людей.

[0234] ТТР является одним из по меньшей мере тридцати различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразии агрегатных структур, как полагают, вызывает дегенеративные заболевания, называемые амилоидными заболеваниями. ТТР должен претерпеть конформационные изменения, чтобы стать амилоидогенным. Диссоциация тетрамера ТТР и частичное разворачивание раскрывает участки по существу незаряженных гидрофобных остатков в развернутой конформации, которые эффективно неправильно собираются в по существу полностью неструктурированные сферические агрегаты, которые в конечном итоге претерпевают конформационное преобразование в амилоидные структуры с бета-листами.

[0235] Если иное не очевидно из контекста, отсылка к транстиретину (ТТР) или его фрагментам или доменам включает в себя природные аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутантные (например, E89K и E89Q), и аллельные варианты. Иллюстративные полипептидные последовательности ТТР обозначаются номерами доступа P02766.1 (UniProt) (SEQ ID NO:26), AAB35639.1 (GenBank) (SEQ ID NO:27), AAB35640.1 (GenBank) (SEQ ID NO:28), и ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NO:29). Остатки нумеруются в соответствии с P02766.1 Swiss Prot, с первой аминокислоты зрелого белка (то есть, не включая 20-аминокислотную сигнальную последовательность), обозначенной остатком 1. В любом другом белке ТТР остатки нумеруются согласно соответствующим остаткам в P02766.1 при максимальном выравнивании.

III. Транстиретиновый амилоидоз

[0236] Транстиретиновый (ТТР) амилоидоз представляет собой системное нарушение, характеризующееся патогенным, неправильным свернутым ТТР и внеклеточным отложением амилоидных фибрилл, состоящих из ТТР. ТТР амилоидоз обычно вызван дестабилизацией нативной тетрамерной формы ТТР (из-за условий среды или генетических патологий), что приводит к диссоциации, неправильному свертыванию и агрегации ТТР 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).

[0237] У людей, как тетрамеры ТТР дикого типа, так и смешанные тетрамеры, состоящие из субъединиц мутантного и дикого типа, могут диссоциировать, неправильно свертываются и агрегировать, причем процесс амилоидогенеза приводит к дегенерации пораженной ткани. Таким образом, ТТР амилоидозы включают заболевания, вызванные патогенным неправильно свернутым ТТР, возникающим в результате мутаций в ТТР, или возникающим из не мутированного, неправильно свернутого ТТР.

[0238] Например, амилоидоз АТТР дикого типа (также называемый старческим системным амилоидозом или ССА) и старческий сердечный амилоидоз (ССерА) представляют собой возрастные типы амилоидоза, которые возникают в результате отложения ТТР амилоида дикого типа за пределами и внутри кардиомиоцитов сердца. ТТР амилоидоз также является наиболее распространенной формой наследственного (семейного) амилоидоза, который вызван мутациями, которые дестабилизируют белок ТТР. ТТР амилоидозы, связанные с точечными мутациями в гене ТТР, включают наследственную амилоидную полиневропатию (НАП), наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК) и редкий избирательный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС). Пациенты с наследственным (семейным) ТТР амилоидозом по существу всегда являются гетерозиготами, что означает, что тетрамеры ТТР состоят из субъединиц ТТР мутантного и/или дикого типа, в целом, как правило, статистически распределены. Наследственные (семейные) формы амилоидоза ТТР, как правило, являются аутосомно-доминантными и, как правило, имеют более раннее проявление первых симптомов, чем спорадические заболевания (ССА и СсерА).

[0239] В гене, кодирующем ТТР, более 100 мутаций, которые связывают с аутосомно-доминантными нарушениями НАП и НАК. 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 ТТР. Как правило, чем более дестабилизирующими для тетрамерной структуры ТТР являются мутантные субъединицы, тем раньше проявляются первые симптомы амилоидного заболевания. Патогенный потенциал варианта ТТР в целом, как правило, определяется комбинацией его нестабильности и эффективности его клеточной секреции. Первоначальная патология, вызванная некоторыми вариантами ТТР, является результатом их избирательного разрушения сердечной ткани, тогда как другие варианты ТТР приводят к нарушениям в периферической и вегетативной нервной системах. Повреждение ткани, вызванное ТТР амилоидогенезом, по-видимому, обусловлено главным образом

токсичностью небольших, диффундирующих агрегатов ТТР, хотя накопление внеклеточного амилоида может способствовать и по существу наверняка приводит к изменению структуры органа на поздних стадиях амилоидоза ТТР. Иллюстративные мутации ТТР включают в себя V30M, Y114C, G47R, S50I, E61L, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q и V122I.

[0240] Амилоидоз ТТР представлен многими различными формами, со значительными фенотипическими различиями между индивидами и географическими регионами. Например, амилоидоз ТТР может представлять собой прогрессирующую, аксональную сенсорную вегетативную и моторную невропатию. Амилоидоз ТТР может также представлять собой проникающую кардиомиопатию.

[0241] Возраст проявления первых симптомов, связанных с болезнью, колеблется между вторым и девятым десятилетиями жизни с большими вариациями в разных популяциях. Мультисистемное поражение амилоидозом ТТР является ключом к его диагностике. Например, диагноз амилоидоза ТТР рассматривается при наличии одного или нескольких следующих факторов: 1) семейный анамнез невропатического 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 атрио-вентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и 6) включения в стекловидном теле по типу ваты. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Другие симптомы могут включать, например, полинейропатию, потерю чувствительности, боль, слабость нижних конечностей, дисгидроз, диарею, запор, потерю веса и недержание/удержание мочи.

[0242] Диагностика амилоидоза ТТР обычно основывается на биопсии органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя «конго красный». Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание и масс-спектроскопическая идентификация ТТР, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за образование амилоида, действительно является ТТР. Антитела, раскрытые в данном документе полезны в различение транстиретин-опосредованного амилоидоза и не-амилоидоза ТТР, например, амилоидоза с

амилоидом легкой цепи (АЛ), также известного как первичный системный амилоидоз. Для наследственных форм заболевания, затем необходимо показать мутацию в гене, кодирующем ТТР, до того, как будет поставлен диагноз. Это можно достигнуть, например, посредством изоэлектрического фокусирующего электрофореза, полимеразной цепной реакции или лазерной диссекции/жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией. Смотрите, например, US 2014/0056904; Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

IV. Антитела

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[0243] Согласно изобретению предложены моноклональные антитела, связывающиеся с белком транстиретином (ТТР), более конкретно, с эпитопами в пределах аминокислотных остатков 89-97 (SEQ ID NO: 45) или эпитопами в пределах аминокислотных остатков 101-109 (SEQ ID NO: 30) ТТР. Такие эпитопы являются скрытыми в нативном тетрамере ТТР и экспонированы в мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных формах ТТР.

[0244] Некоторые антитела включают в себя 9D5, 18C5, и их химерные венеризованные и гуманизированные формы. 9D5 специфически связывается с аминокислотными остатками 89-97 (SEQ ID NO: 45) ТТР. 18C5 специфически связывается с аминокислотными остатками 101-109 (SEQ ID NO: 30) ТТР. Эти антитела дополнительно характеризуются их способностью связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами ТТР, но не с нативной тетрамерной формой ТТР. Способность связываться с конкретными белками или их фрагментами может быть продемонстрирована с использованием иллюстративных форматов анализов, представленных в примерах. Если иное не очевидно из контекста, ссылка на 9D5 или 18C5 должна пониматься как ссылка на любую из мышинных, химерных, венеризованных или гуманизированных форм. Линия гибридомных клеток, которая продуцирует моноклональное антитело 9D5, была депонирована в Патентном хранилище Американской коллекции типовых культур (АТСС), Манассас, Вирджиния, 20110-2209 4 апреля 2017 года, и ей присвоено патентное депонирование № РТА-124078. Линия гибридомных клеток, которая продуцирует моноклональное антитело 18C5, была депонирована в Патентном хранилище Американской коллекции типовых культур (АТСС), Манассас, Вирджиния, 20110-2209, 31 октября 2017 года, и ей было патентное депонирование № РТА-124570.

[0245] Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом что и антитело, обозначенное как 9D5. Последовательности зрелых переменных областей

тяжелой и легкой цепей 9D5 обозначены как SEQ ID NO: 81 и 82, соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей с ТТР, или его частью, включая желаемый эпитоп (например, SEQ ID NO: 45), и скрининга полученных антител на связывание с мономерным ТТР или пептидом, содержащим SEQ ID NO: 45, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим переменные области 18C5 мыши (IgG1, каппа). Фрагменты ТТР, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать ответ антитела на фрагмент, и/или могут быть объединены с адьювантом, который помогает вызвать такой ответ. Такие антитела могут быть подвергнуты скринингу на характерное связывание с мономерными вариантами ТТР дикого типа или их фрагментом (например, SEQ ID NO: 26) по сравнению с мутантами по указанным остаткам.

Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и антитело, обозначенное как 18C5. Последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей 18C5 обозначены SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, могут быть получены путем иммунизации мышей ТТР, или его частью, включая желаемый эпитоп (например, SEQ ID NO: 30), и скрининга полученных антител на связывание с мономерным ТТР или пептидом, содержащим SEQ ID NO: 30, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим переменные области 18C5 мыши (IgG1, каппа). Фрагменты ТТР, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать ответ антитела на фрагмент, и/или могут быть объединены с адьювантом, который помогает вызвать такой ответ. Такие антитела могут быть подвергнуты скринингу на характерное связывание с мономерными вариантами ТТР дикого типа или их фрагментом (например, SEQ ID NO: 26) по сравнению с мутантами по указанным остаткам.

Скрининг при сравнении с такими мутантами более точно определяет специфичность связывания, что позволяет идентифицировать антитела, связывание которых ингибируется мутагенезом определенных остатков и которые, вероятно, будут обладать функциональными свойствами других иллюстративных антител. Мутации могут быть систематической замещающей заменой аланином (или серином или глицином, если уже присутствует аланин), по одному остатку за раз, или заменой более широкими интервалами по всей мишени или по всему её участку, в котором, как известно, находится эпитоп. Если один и тот же набор мутаций значительно снижает связывание двух антител, оба антитела связывают один и тот же эпитоп.

[0246] Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 9D5 или 18C5), 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 вариабельную область или тяжелой, или легкой цепи выбранного антитела мыши. Если, например, в качестве исходного материала выбрана вариабельная область легкой цепи, то создают библиотеку фагов, в которой элементы отображают одну и ту же вариабельную область легкой цепи (то есть исходный материал мыши) и другую вариабельную область тяжелой цепи. Вариабельные области тяжелой цепи можно, например, получить из библиотеки перегруппированных вариабельных 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 ТТР или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97 или аминокислотных остатков 101-109). Вариабельная 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 вариабельную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплей-библиотеки), и другую вариабельную область легкой цепи. Вариабельные области легкой цепи могут быть получены, например, из библиотеки перегруппированных вариабельных областей легкой цепи человека. Опять же, выбирают фаг, демонстрирующий сильное специфическое связывание для мономерного ТТР или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 89-97 или аминокислотных остатков 101-109). Полученные антитела обычно имеют такую же или сходную специфичность к эпитопу, что и исходный материал мыши.

[0247] Другие антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 9D5 или 18C5. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны антителу 9D5 или 18C5 по аминокислотной последовательности вариабельных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепи, и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также включены моноклональные антитела, имеющие по меньшей мере одну или все шесть CDR, как определено в соответствии с любым общепринятым соглашением, но предпочтительно по Кабату, которые являются на 90%, 95%, 99% или 100% идентичными соответствующим CDR антитела 9D5 или 18C5.

[0248] В изобретении также предложены антитела, имеющие некоторые или все

(например, 3, 4, 5 и 6) CDR полностью или практически полностью из 9D5 или 18C5. Такие антитела могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или по существу полностью из вариабельной области тяжелой цепи антитела 9D5 или 18C5, и/или вариабельную область легкой цепи, имеющая по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или по существу полностью из вариабельной области легкой цепи антитела 9D5 или 18C5. Антитела могут также содержать как тяжелые, так и легкие цепи. CDR является по существу полностью взят из соответствующего CDR антитела 9D5 или 18C5, 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 18C5 по аминокислотной последовательности вариабельных зрелой тяжелой и/или легкой цепи(-ей), и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от антитела 9D5 или 18C5 небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок.

[0249] CDR по Кабату (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) тяжелой цепи 9D5 обозначены как SEQ ID NO: 75, 76 и 77, соответственно, и CDR по Кабату (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) легкой цепи 9D5 обозначены как SEQ ID NO: 78, 79 и 80, соответственно.

[0250] CDR по совмещенной Кабат/Чотиа (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) тяжелой цепи 18C5 обозначены как SEQ ID NO: 5, 7 и 9, соответственно, и CDR по совмещенной Кабат/Чотиа (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) легкой цепи 18C5 обозначены как SEQ ID NO: 11, 13 и 15, соответственно.

[0251] В Таблице 2 указаны CDR 18C5, как определено по Кабату, Чотиа, совмещенной (нумерации) по Кабату и Чотиа (также называемый в данной документе «по совмещенной Кабату/Чотиа»), АтМ и контакт.

Таблица 2

CDR 18C5, как определено по Кабату, Чотиа, совмещенной по Кабату и Чотиа, АтМ и Контакт, применяя нумерацию по Кабату

Петля	По Кабату	По Чотиа	Совмещенная по Чотиа и Кабату	АтМ	Контакт

L1	L24-L34 SEQ ID NO: 11	L24-L34 SEQ ID NO: 11	L24-L34 SEQ ID NO: 11	L24-L34 SEQ ID NO: 11	L30-L36 SEQ ID NO: 100
L2	L50-L56 SEQ ID NO:13	L50-L56 SEQ ID NO: 13	L50-L56 SEQ ID NO: 13	L50-L56 SEQ ID NO: 13	L46-L55 SEQ ID NO: 101
L3	L89-L97 SEQ ID NO: 15	L89-L97 SEQ ID NO: 15	L89-L97 SEQ ID NO: 15	L89-L97 SEQ ID NO: 15	L89-L96 SEQ ID NO: 102
H1	H31-H35B SEQ ID NO: 93	H26-H32 SEQ ID NO: 94	H26-H35B SEQ ID NO: 5	H26-H35B SEQ ID NO: 5	H30-H35B SEQ ID NO: 95
H2	H50-H65 SEQ ID NO: 7	H52-H56 SEQ ID NO: 96	H50-H65 SEQ ID NO: 7	H50-H58 SEQ ID NO: 97	H47-H58 SEQ ID NO: 98
H3	H95-H102 SEQ ID NO: 9	H95-H102 SEQ ID NO: 9	H95-H102 SEQ ID NO: 9	H95-H102 SEQ ID NO: 9	H93-H101 SEQ ID NO: 99

[0252] Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться с мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами ТТР, но не с нативной тетрамерной формой ТТР, как описано в примерах или где-либо еще. Аналогично, некоторые антитела являются иммунореактивными к ткани, подверженной ТТР-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой ткани.

[0253] Некоторые антитела могут ингибировать или уменьшать агрегацию ТТР, ингибировать или уменьшать образование фибрилл ТТР, уменьшать или удалять отложения ТТР, либо агрегированный ТТР, или стабилизировать нетоксичные конформации ТТР в животной модели или клинических испытаниях. Некоторые антитела могут лечить, оказывать профилактическое действие или замедлять начало проявления первых симптомов амилоидоза ТТР, как показано на животной модели или клинических

испытаниях. Иллюстративные модели животных для исследования активности против амилоидоза ТТР включают в себя 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).

[0254] Анти-ТТР антитела, включая их химерные и гуманизированные варианты, полезны в комбинированных вариантах лечения, в биспецифических антителах, в способах диагностики и/или лечения нарушений, связанных с ТТР, и в способах обнаружения ТТР. Такие анти-ТТР антитела могут включать в себя антитела, как в Таблице 3 ниже.

Таблица 3
Анти-ТТР антитела.

Название	Эпитоп на ТТР как сообщено	VH/VL или CDR как сообщено	Источник
9D5	EHAЕVVFTA (89-97) (SEQ ID NO: 45)	CDR по Кабату: CDR-H1 SEQ ID NO: 75 CDR-H2 SEQ ID NO: 76 CDR-H3 SEQ ID NO: 77 CDR-L1 SEQ ID NO: 78 CDR-L2 SEQ ID NO: 79 CDR-L3 SEQ ID NO: 80	WO 2016/120810 A1 депозит АКТК № РТА-124078 Дата: 4 апреля 2017 года
14G8	EHAЕVVFTA (89-97) (SEQ ID NO: 45)	CDR по Кабату CDR-H1 SEQ ID NO: 39 CDR-H2 SEQ ID NO: 40 CDR-H3 SEQ ID NO:	WO 2016/120810 A1 депозит АКТК № РТА-124079 Дата: 4 апреля 2017 года

		41 CDR-L1 SEQ ID NO: 42 CDR-L2 SEQ ID NO: 43 CDR-L3 SEQ ID NO: 44	
5A1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO: 45)	CDR по Кабату CDR-H1 SEQ ID NO: 46 CDR-H2 SEQ ID NO: 47 CDR-H3 SEQ ID NO: 48 CDR-L1 SEQ ID NO: 49 CDR-L2 SEQ ID NO: 50 CDR-L3 SEQ ID NO: 51	WO 2016/120811 депозит АКТК № РТА-124080 Дата: 4 апреля 2017 года
6C1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO: 45)	CDR по Кабату CDR-H1 SEQ ID NO: 52 CDR-H2 SEQ ID NO: 53 CDR-H3 SEQ ID NO: 54 CDR-L1 SEQ ID NO: 55 CDR-L2 SEQ ID NO: 56 CDR-L3 SEQ ID NO: 57	WO 2016/120809 депозит АКТК № РТА-124077 Дата: 4 апреля 2017 года
18C5	GPRRYTIAA (101-109) (SEQ ID	CDR по совмещенной Кабата/Чютиа:	Предварительная заявка США №

	NO: 30)	CDR-H1 SEQ ID NO: 5 CDR-H2 SEQ ID NO: 7 CDR-H3 SEQ ID NO: 9 CDR-L1 SEQ ID NO: 11 CDR-L2 SEQ ID NO: 13 CDR-L3 SEQ ID NO: 15	62/596438, поданная 6 октября 2017 года
AD7F6		VH SEQ ID NO: 58 VL SEQ ID NO: 59	WO 2010/030203 A1
RT24	118-122, 115-124	CDR-H1 SEQ ID NO: 60 CDR-H2 SEQ ID NO: 61 CDR-H3 SEQ ID NO: 62 CDR-L1 SEQ ID NO: 63 CDR-L2 SEQ ID NO: 64 CDR-L3 SEQ ID NO: 65	WO 2015/115331
NI-301.35G11	53-63, 54-61	CDR-H1 SEQ ID NO: 66 CDR-H2 SEQ ID NO: 67 CDR-H3 SEQ ID NO: 68 CDR-L1 SEQ ID NO: 69 CDR-L2 SEQ ID NO: 70	US 2016/0355576 A1

		CDR-L3 SEQ ID NO: 71	
MFD101, MDF102, MFD103, MFD105	ADDTWEPFASGKT (остатки 36-49) (SEQ ID NO: 72)		US 2016/0039916 A
MFD107, MFD108, MFD109, MFD111	TSESGELHGLTTE (остатки 49-61) (SEQ ID NO: 73)		US 2016/0039916 A1
MFD114	ALLSPYSYSTTAV (остатки 109-121) (SEQ ID NO: 74)		US 2016/0039916 A1
	30-66		US 2016/0039916 A1
	70-127		US 2016/0039916 A1
	80-127		US 2016/0039916 A1
	90-127		US 2016/0039916 A1
	100-127		US 2016/0039916 A1
	110-127		US 2016/0039916 A1
	115-127		US 2016/0039916 A1

B. Нечеловеческие антитела

[0255] Производство других нечеловеческих антител, например, антител мыши, морской свинки, примата, кролика или крысы, к мономерному ТТР или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 89-97 или аминокислотным остаткам 101-109) может быть осуществлено, например, путем иммунизации животного с помощью ТТР или его фрагмента. 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 адьювантом. Могут быть использованы несколько типов адьювантов, 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 ТТР или эпитопом в ТТР (например, эпитопом, содержащим один или большее количество аминокислотных остатков 89-97 или аминокислотных остатков 101-109). Такой скрининг может быть осуществлен путем определения связывания антитела с набором мономерных вариантов ТТР, таких как варианты ТТР, содержащие аминокислотные остатки 89-97, аминокислотные остатки 101-109, или мутации в пределах этих остатков, и путем определения того, какие варианты ТТР связываются с антителом. Связывание может быть оценено, например, вестерн-блоттингом, FACS (проточной цитометрией), или ИФА.

С. Гуманизированные антитела

[0256] Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого «донорного» антитела встраивают в последовательности «акцепторного» антитела человека (смотрите, 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 областей зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полностью или по существу полностью из донорных антител, и каркасные последовательности вариабельной области, и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу полностью из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу полностью из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, по существу полностью из каркаса вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей константной области человека. Подобным образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR, полностью или по существу полностью из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области легкой цепи, и константную область легкой цепи, если она присутствует, по существу полностью из каркаса вариабельной области легкой цепи и последовательностей константной области

человека. Помимо нанотел и дАт (доменное антитело), гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе является по существу полностью из соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определено по Кабату) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности вариабельной области цепи антитела или константной области цепи антитела являются по существу полностью из каркасной последовательности вариабельной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных согласно общепринятому соглашению, но предпочтительно определено по Кабату, являются идентичными. Чтобы быть классифицированным как гуманизированное, в соответствии с определением гуманизированных антител, согласно Международным непатентованным наименованиям (МНН) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2014 года, антитело должно иметь по меньшей мере 85% идентичности в зрелых вариабельных областях с последовательностями антител зародышевой линии человека (то есть до соматической гипермутации). Смешанные антитела представляют собой антитела, для которых одна цепь антитела (например, тяжелая цепь) соответствует пороговому значению, а другая цепь (например, легкая цепь) не соответствует пороговому значению. Антитело классифицируют как химерное, если ни одна из цепей не соответствует пороговому значению, хотя вариабельные каркасные области для обеих цепей были по существу человеческими с некоторыми обратными мутациями мыши. Смотрите, Jones et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. Смотрите также «WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (обзор)» (Интернет) 2014. Доступно по: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>, включено в данный документ посредством ссылки. Во избежание неясности, термин «гуманизированный», как применяется в данном документе, не предназначен для ограничения определением гуманизированных антител МНН ВОЗ 2014 года. Некоторые из гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека по одной или обоим зрелым вариабельным областям, и некоторые из гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют меньше чем 85% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека

пр одной или обеим зрелым вариабельным областям. Некоторые из зрелых вариабельных областей тяжелой цепи гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют от около 60% до 100% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, как, например, в диапазоне от около 60% до 69%, от 70% до 79%, от 80% до 84% или от 85% до 89%. Некоторые из зрелых вариабельных областей тяжелых цепей подпадают под определение МНН ВОЗ 2014 года, и имеют, например, около 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% или 82%, 83% или 84% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, в то время как другие зрелые вариабельные области тяжелой цепи соответствуют определению МНН ВОЗ от 2014 года, и имеют около 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или больше идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из зрелых вариабельных областей легкой цепи гуманизированных антител, предложенных в данном документе, имеют от около 60% до 100% идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, как, например, в диапазоне от около 80% до 84%, или от 85% до 89%. Некоторые из зрелых вариабельных областей легкой цепи попадают под определение МНН ВОЗ 2014 года и имеют, например, идентичность последовательностей около 81%, 82%, 83% или 84% с последовательностями зародышевой линии человека, тогда как другие зрелые вариабельные области легкой цепи соответствуют определению МНН ВОЗ 2014, и имеют около 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или больше идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, которые являются «химерными» по определению МНН ВОЗ 2014 года, имеют зрелые вариабельные области тяжелой цепи с меньше чем 85% идентичностью с последовательностями зародышевой линии человека в сочетании с зрелыми вариабельными областями легкой цепи, имеющими меньше чем 85% идентичности с последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, являются «смешанными» по определению МНН ВОЗ 2014 года, например, имеют зрелую вариабельную область тяжелой цепи с по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, в сочетании с зрелой вариабельной областью легкой цепи, имеющей меньше чем 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, или наоборот. Некоторые гуманизированные антитела, предложенные в данном документе, соответствуют определению «гуманизированный» МНН ВОЗ 2014, и имеют зрелую вариабельную область тяжелой цепи с по меньшей мере 85% идентичности

последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, в сочетании с вариабельной областью зрелой легкой цепи, имеющей по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека. Иллюстративные антитела 18C5, которые соответствуют определению «гуманизированный» МНН ВОЗ 2014, включают в себя антитела, имеющие зрелую вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86, в сочетании с зрелой вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92.

[0257] Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (предпочтительно определены по Кабату) из антитела мыши, они также могут быть сконструированы с меньше, чем всеми CDR (например, по меньшей мере 3-мя, 4-мя, 5-тью 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).

[0258] 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 CDRH2 часто не требуются), на основании областей CDR по Кабату, расположенных вне гипервариабельных петель по Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в позициях, в которых отсутствует один или большее количество донорных остатков CDR, или в которых отсутствует весь донорный CDR, аминокислота, занимающая позицию, может быть аминокислотой, занимающей соответствующую позицию (по нумерации Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен акцептора для донорных аминокислот в CDR что должны быть включены, отражают баланс конкурирующих предпочтений. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замены могут также вызывать изменения аффинности, и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Также могут быть выбраны эмпирически заменяемые позиции в пределах CDR, и аминокислоты для замены.

[0259] Последовательности акцепторного антитела человека могут быть необязательно выбраны из многих известных последовательностей антител человека для

того, чтобы обеспечить высокую степень идентичности последовательности (например, идентичность 65-85%) между каркасами вариабельной области последовательности акцептора человека и соответствующими каркасами вариабельной области цепи донорного антитела.

[0260] Примером акцепторной последовательности для тяжелой цепи 18C5 является гуманизованная VH Fab кренизумаба (CreneFab) с номером доступа 5VZY в PDB (SEQ ID NO: 83). Примером акцепторной последовательности для легкой цепи 18C5 является гуманизованная VL Fab кренизумаба (CreneFab) с номером доступа 5VZY в PDB (SEQ ID NO: 89). Другим примером акцепторной последовательности для легкой цепи 18C5 является ген зародышевой линии человека - IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 90).

[0261] Если выбирают более одной акцепторной последовательности антитела человека для цепи (либо легкой, либо тяжелой), может быть использован композит или гибрид этих акцепторов для той цепи, и аминокислоты, используемые в разных, могут быть взяты из любых используемых акцепторных последовательностей антитела человека.

[0262] Могут быть выбраны определенные аминокислоты из остатков в каркасе вариабельной области человека для замены, исходя из их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывания с антигеном. Исследование таких возможных влияний заключается в моделировании, изучении характеристик аминокислот в определенных местах, или эмпирическом наблюдении эффектов замены или мутагенеза определенных аминокислот.

[0263] Например, когда аминокислота различается между каркасным остатком вариабельной области мыши и выбранным каркасным остатком вариабельной области человека, аминокислота в человеческом каркасе может быть замещена эквивалентной каркасной аминокислотой из мышинового антитела, если разумно ожидать, что аминокислота:

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

[0264] Согласно данному изобретению предложены гуманизированные формы антитела 18C5 мыши, включая 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи (гум18C5-VH_v1 (SEQ ID NO: 85) и гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 86)), и 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области легкой цепи (гум18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91) и гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)).

[0265] В одном варианте осуществления, гуманизированные последовательности создают с использованием двухстадийного протокола ПЦР, который позволяет вносить множественные мутации, делеции и вставки с использованием сайт-направленного мутагенеза QuikChange [Wang, W. and Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682)].

[0266] Аминокислотные остатки каркаса из классов (1) - (3), как определено Queen, US 5530101, иногда упоминаются в качестве альтернативы как канонические остатки и остатки Вернье. 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 антиген-связывающей петли и играют определенную роль в тонкой подгонке антитела к антигену, иногда упоминаются как остатки Вернье (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

[0267] Другими остатками каркаса, которые представляют собой кандидаты на замену, являются остатки, создающие потенциальный сайт гликозилирования. Еще другими кандидатами на замещение являются каркасные аминокислоты акцептора человека, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этой позиции. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентной позиции донорного антитела мыши, или из эквивалентных позиций более типичных человеческих иммуноглобулинов.

[0268] Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами на замещение, представляют собой N-концевые остатки глутаминовой кислоты (E), которые могут быть заменены на глутамин (Q).

[0269] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 18C5 мыши, обозначенные гум18C5.

[0270] Антитело 18C5 мыши содержит зрелые переменные области тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности, включающие в себя SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 87, соответственно. Согласно данному изобретению предложены 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области тяжелой цепи: гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VH_v2. Согласно данному изобретению дополнительно

предложены 2 иллюстративные гуманизированные зрелые переменные области легкой цепи: гум18C5-VL_v1 и гум18C5-VL_v2. Выравнивание 18C5 мыши и различных гуманизированных антител показано для переменных областей легкой цепи (Таблица 8 и Фиг. 12) и переменных областей тяжелой цепи (Таблица 9 и Фиг. 11).

[0271] По причинам, таким как: возможное влияние на конформацию CDR и/или связывание с антигеном, опосредование взаимодействия между тяжелыми и легкими цепями, взаимодействие с константной областью, является сайтом для желательной или нежелательной посттрансляционной модификации, является необычным остатком для своей позиции в последовательности переменной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию, и другим причинам, следующие 8 позиций в каркасе переменной области 18C5 были рассмотрены в качестве кандидатов на замещения в 2-ух иллюстративных зрелых переменных областях легкой цепи, и в 2 иллюстративных зрелых переменных областях тяжелой цепи, как дополнительно указано в Примере 7: L2 (I2V), L45 (Q45R), H37 (V37A), H45 (L45Q), H47 (L47W), H48 (V48I), H49 (A49G), и H94 (S94R).

[0272] Здесь, как и в других местах, первый упомянутый остаток представляет собой остаток гуманизированного антитела, сформированного путем вставки CDR по Кабату или CDR по совмещенной Чотиа-Кабата, в случае CDR-H1, в каркас акцептора человека, а второй упомянутый остаток представляет собой остаток, который рассматривается как заменяющий такой остаток. Таким образом, в пределах каркасов переменной области, первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR, первый упомянутый остаток является мышинным.

[0273] Иллюстративные антитела включают в себя любые перестановки или комбинации иллюстративных зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепи 18C5 например, гум18C5VH_v1/гум18C5VL_v1, гум18C5VH_v1/гум18C5VL_v2, гум18C5VH_v2/гум18C5VL_v1, или гум18C5VH_v2/гум18C5VL_v2.

[0274] Согласно данному изобретению предложены варианты гуманизированного антитела 18C5, в котором гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует идентичность по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любому из гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VH_v2. (SEQ ID NO: 85-86) и гуманизированная зрелая переменная область легкой цепи показывает идентичность по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любому из гум18C5-VL_v1 и гум18C5-VL_v2, (SEQ ID NO: 91-92). В некоторых таких антителах сохраняют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из обратных мутаций, или других мутаций, обнаруженных в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 92.

[0275] В некоторых гуманизированных антителах 18C5, по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой как указано: H37 занята V или A, H45 занята L или Q, H47 занята L или W, H48 занята L или I, H49 занята A или G, и H94 занята S или R.

[0276] В некоторых гуманизированных антителах 18C5, позиции H37, H45, H47, H48, H49 и H94 в области VH заняты A, Q, W, I, G и R соответственно, как в гум18C5-VH_v2.

[0277] В некоторых гуманизированных антителах 18C5, по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой как указано: L2 занята I или V, а L45 занята Q или R.

[0278] В некоторых гуманизированных антителах 18C5, позиции L2 и L45 в области VL заняты V и R соответственно, как в гум18C5-VL_v2.

[0279] В некоторых гуманизированных антителах 18C5, переменная тяжелая цепь имеет $\geq 85\%$ идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизированных антителах 18C5, переменная легкая цепь имеет $\geq 85\%$ идентичности с человеческой последовательностью. В некоторых гуманизированных антителах 18C5, каждая переменная тяжелая цепь и переменная легкая цепи имеет $\geq 85\%$ идентичности с последовательностью зародышевой линии человека.

[0280] Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или по существу полностью идентичными областям CDR 9D5 или 18C5 мышинового донорного антитела. Области CDR могут быть определены согласно любому общепринятому соглашению, например как те, что в Таблице 1, но предпочтительно, как определено по Кабату или совмещенной нумерации по Чотиа+Кабат.

[0281] Каркасные позиции переменных областей соответствуют нумерации по Кабату, если не указано иное. Другие такие варианты обычно отличаются от последовательностей иллюстративных тяжелой и легкой цепей гум18C5 небольшим числом (например, обычно не больше чем 1, 2, 3, 5, 10 или 15) замен, делеций или инсерций.

[0282] Возможностью для дополнительных вариаций в гуманизированных вариантах 9D5 или 18C5 являются дополнительные обратные мутации в каркасах переменной области. Многие из остатков каркаса, не контактирующих с CDR в гуманизированном мАт, могут вмещать замены аминокислот из соответствующих позиций донорного мАт 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 вариабельной области. Кроме того, альтернативные последовательности акцептора человека могут быть использованы, например, для тяжелой и/или легкой цепей. Если применяются различные акцепторные последовательности, одна или большее количество рекомендованных выше обратных мутаций могут не выполняться, поскольку соответствующие донорные и акцепторные остатки уже одинаковы без обратных мутаций.

[0283] Некоторые замены или обратные мутации в вариантах гум9D5 или гум18C5 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного мАт, то есть его способность связываться с мономерным ТТР (например, активность в некоторых или всех анализах, описанных в данных примерах, варианта гуманизированного антитела 9D5 или 18C5, является по существу, такой же, то есть в пределах экспериментальной погрешности, как и у 9D5 или 18C5 мыши). Иллюстративные гуманизированные варианты 9D5 описаны в WO 2016/120810.

D. Химерные и венированные антитела

[0284] В изобретении дополнительно предложены химерные и венированные формы нечеловеческих антител, в частности антитела 9D5 или 18C5 примеров.

[0285] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые вариабельные области легких и тяжелых цепей нечеловеческого антитела (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепей человека. Такие антитела по существу полностью или полностью сохраняют специфичность связывания мышинового антитела, и составляют примерно две трети человеческой последовательности. В одном варианте осуществления, химерное антитело 18C5 имеет аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 81, аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 87, аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человека SEQ ID NO: 17, и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи человека SEQ ID NO: 19. Иллюстративное химерное антитело 9D5 описано в WO 2016/120810.

[0286] Венированное антитело является типом гуманизированного антитела, которое сохраняет некоторые и, как правило, все CDR, и некоторые остатки каркаса нечеловеческой вариабельной области нечеловеческого антитела, но в котором заменяют другие каркасные остатки вариабельной области, которые могут вносить вклад в В- или Т-клеточные эпитопы, например, экспонированные остатки (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) на остатки из соответствующих позиций последовательности человеческого

антитела. Результатом является антитело, в котором CDR взяты полностью или по существу полностью из нечеловеческого антитела, и каркасы вариабельной области нечеловеческого антитела делают более подобными таковым человека с помощью замен. Венированные формы антител 9D5 или 18C5 включены в изобретение.

E. Антитела человека

[0287] Человеческие антитела к мономерному ТТР или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 89-97 (SEQ ID NO: 45) ТТР, или аминокислотным остаткам 101-109 (SEQ ID NO: 30) ТТР 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 ТТР, такой как вариант ТТР, содержащий только аминокислотные остатки 89-97 или аминокислотные остатки 101-109 ТТР, в качестве целевого антигена, и/или скрининг антител против набора вариантов ТТР, таких как варианты ТТР, содержащие различные мутации в аминокислотных остатках 89-97 или аминокислотных остатках 101-109 ТТР.

[0288] Способы получения человеческих антител включают: способ триомы Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman *et al.*, патент США № 4634666, использование трансгенной мыши, содержащей гены иммуноглобулинов человека (смотрите, например, Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); и Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) и способы фагового дисплея (смотрите, например, Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743; и US 5565332).

F. Выбор константной области

[0289] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей химерных, венированных или гуманизированных антител могут быть соединены по меньшей мере с частью константной области антитела человека. Выбор константной области зависит от желаемого эффекта, будь то антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или зависимость от комплемента цитотоксичность. Например, изоформы IgG1 и IgG3 человека могут вызывать зависимость от комплемента цитотоксичность, а изоформы IgG2 и IgG4 человека - не могут. IgG1 и IgG3

человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константными областями легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Соглашения о нумерации для константных областей включают в себя нумерацию EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)), нумерацию по Кабату (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991,)) уникальную нумерацию IMGT (Lefranc M.-P. et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, Dev. Comp. Immunol., 29, 185- 203 (2005)), и нумерацию экзонов IMGT (Lefranc, выше).

[0290] Одна или большее количество аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, 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 комплемент-опосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (смотрите, 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 (смотрите, например, Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают в себя Gln в позиции 250 и/или Leu в позиции 428 (нумерация EU используется в этом параграфе для константной области) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любой или во всех позициях 234, 235, 236 и/или 237 уменьшает аффинность к рецепторам Fcγ, в частности к рецептору FcγRI (смотрите, например, US 6624821). Может быть использована замена на аланин 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, позиции 234, 236 и/или 237 в IgG2 человека замещают аланином, а позицию 235 - глутамином (смотрите, например, US 5624821). В некоторых антителах используется мутация в одной или большем количестве позиций 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 и 331 по нумерации EU IgG1 человека. В некоторых антителах используется мутация в одной или нескольких позициях 318, 320 и 322 по нумерации EU 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: 23. В некоторых антителах, изотипом является IgG2 или IgG4 человека.

[0291] Иллюстративная константная область каппа-легкой цепи человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. N-концевой аргинин SEQ ID NO: 24

может быть опущен, и в этом случае константная область каппа-легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. Иллюстративная константная область тяжелой цепи IgG1 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (с или без С-концевого лизина). Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и F_v, или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

[0292] 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 большего количества других изотипов. Так, например, другая константная область тяжелой цепи относится к аллотипу G1m3 IgG1 и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. Другая константная область тяжелой цепи аллотипа G1m3 IgG1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 (с или без С-концевого лизина). Отсылка к константной области антитела человека включает в себя константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих позиции в природных аллотипах.

G. *Экспрессия рекомбинантных антител*

[0293] Известен ряд способов продуцирования химерных и гуманизированных антител с использованием клеточной линии, экспрессирующей антитела (например, гибридомы). Например, иммуноглобулиновые переменные области антител могут быть клонированы и секвенированы с использованием хорошо известных способов. В одном способе, переменную область VH тяжелой цепи клонируют с помощью ОТ-ПЦР, 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 Schenk *et al.* (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 ОТ-ПЦР-методики и 3'-g2b-специфического праймера.

[0294] Аналогичным образом можно клонировать переменную область VL легкой

цепи. В одном подходе, набор консенсусных праймеров предназначен для амплификации областей VL используя 5'-праймер, предназначенный для гибридизации с областью VL, включающей кодон инициации трансляции, и 3'-праймер, специфический к области C_k ниже от V-J объединяющей области. Во втором подходе, используется 5' RACE ОТ-ПЦР 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 в себя SEQ ID NO: 32, которая кодирует константную область IgG1 человека, и SEQ ID NO: 33 и 34, которые кодируют константную область каппа-легкой цепи человека.

[0295] В одном из подходов, переменные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для того, чтобы они кодировали соединённые донорные последовательности после соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор для экспрессии в клетках млекопитающего, такой как pCMV-hγ1 для тяжелой цепи и pCMV-McI для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области γ1 и C_k человека как экзонные фрагменты после вставленной кассеты с переменной областью. После проверки последовательности, векторы экспрессии с тяжелой цепью и легкой цепью могут быть совместно трансфицированы в клетки CHO для того, чтобы продуцировать химерные антитела. Среду, частично использованную клетками, собирают через 48 часов после трансфекции и анализируют вестерн-блоттингом на продуцирование антител, или ИФА на связывание антигена. Химерные антитела гуманизированы, как описано выше.

[0296] Химерные, венированные, гуманизированные и человеческие антитела обычно продуцируют с помощью рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с последовательностями, кодирующими цепи антитела, включая природные или гетерологичные элементы контроля экспрессии, такие как промотор. Последовательности контроля экспрессии могут быть промоторными системами в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические или прокариотические клетки-хозяева. Как только вектор был внедрен в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, и сбора, и очистки перекрёстно-реактивных антител.

[0297] 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, устойчивость к ампициллину или устойчивость к гигромицину для того, чтобы можно было обнаружить те клетки, что были трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[0298] *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 в себя 3-фосфоглицераткиназу и другие гликолитические ферменты. Индуцируемые дрожжевые промоторы включают в себя, среди прочего, промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома C и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

[0299] Клетки млекопитающих могут быть использованы для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. Смотрите Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Был создан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают в себя 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 последовательности терминации транскрипции. 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).

[0300] В альтернативном варианте, последовательности, кодирующие антитела, могут быть внесены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (смотрите, например, патент США № 5741957; США № 5304489; и США № 5849992). Подходящие трансгены содержат кодирующие последовательности легких и/или тяжелых цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из специфического гена молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

[0301] Векторы, содержащие интересующие сегменты ДНК, могут быть перенесены в клетку-хозяина способами, зависящими от типа клеточного хозяина. Например,

трансфекция с помощью хлорида кальция обычно используется для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция, электропорация, липофекция, биолистика или трансфекция на основе вирусов могут применяться к другим клеточным хозяевам. Другие способы, используемые для трансформации клеток млекопитающих, включают в себя 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.

[0302] После введения вектора(-ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела, в культуру клеток, клеточные пулы можно проскринировать на рост продуктивности и качество продукта в бессывороточной среде. Топ-продуцирующие пулы клеток затем могут быть подвергнуты поклеточному клонированию на основе FACS для создания моноклональных линий. Могут использоваться специфические урожайности выше 50 пг или 100 пг на клетку в день, которые соответствуют титрам продукта более 7,5 г/л культуры. Антитела, продуцируемые клонами одной клетки, также могут быть протестированы на мутность, фильтрационные свойства, проведены электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГЭ), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), УФ сканирование, ВЭЭХ (высокоэффективная эксклюзионная хроматография), картирование углеводов-олигосахаридов, масс-спектрометрия и анализ связывания, такой как ИФА или Вiascore. Выбранный клон затем может быть перенесен в несколько флаконов и сохранен в замороженном виде для последующего использования.

[0303] 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 (смотрите, в целом, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

[0304] 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 (смотрите, например, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, W02004/050884, W02008/012142, W02008/012142, W02005/019442, W02008/107388, W02009/027471 и US 5888809).

H. Скрининговые исследования антитела

[0305] Антитела могут подвергаться нескольким исследованиям, включая

исследования связывания, исследования функциональности, исследования на животных моделях заболеваний, связанных с отложениями ТТР, и клинические испытания. Исследования связывания тестируют специфическое связывание и, необязательно, аффинность и специфичность к эпитопу, с мономерным ТТР или его фрагментом. Например, в анализах связывания могут подвергать скринингу антитела, которые связываются с аминокислотными остатками 89-97 (SEQ ID NO: 45) или аминокислотными остатками 101-109 (SEQ ID NO: 30) ТТР, представляющими собой эпитопы, которые скрыты в нативном тетрамере ТТР, и экспонированы в мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формах ТТР. Антитела также могут быть подвергнуты скринингу на способность связывать пре-фибрилярные, ненативные конформации ТТР и амилоидные фибриллы ТТР, но не нативные конформации ТТР. Например, антитела могут быть подвергнуты скринингу на способность связываться с мономерными формами ТТР, созданными путем диссоциации или дезагрегации нативного тетрамерного ТТР, и могут быть в тоже время подвергнуты скринингу против нативного тетрамерного ТТР, как описано в примерах, или иным образом. Аналогично, антитела также могут быть подвергнуты скринингу на их иммунореактивность в отношении ткани, подверженной ТТР-опосредованному амилоидозу, но не на здоровой ткани. Такие исследования иногда проводят вместе с конкурентным иллюстративным антителом, таким как антитело, имеющее вариабельные области 9D5 или 18C5 или изотип каппа IgG1. Необязательно, в таком анализе иммобилизуют или антитело, или ТТР-цель.

[0306] Исследования функциональности могут быть выполнены в клеточных моделях, включая клетки, естественно экспрессирующие ТТР, или клетки трансфицированные ДНК, кодирующим ТТР или его фрагмент. Подходящие клетки включают клетки, полученные из сердечной ткани или других тканей, пораженных ТТР амилоидогенезом. Клетки могут быть подвергнуты скринингу на пониженные уровни мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР (например, путем вестерн-блоттинга, или путем иммунопреципитации клеточных экстрактов или супернатантов) или на сниженную токсичность, приписываемую мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам ТТР. Например, антитела могут быть протестированы на способность ингибировать или уменьшать агрегацию ТТР, ингибировать или уменьшать образование фибрилл ТТР, уменьшать отложение ТТР, удалять агрегированный ТТР или стабилизировать нетоксичные конформации ТТР.

[0307] Могут быть выполнены в растворе другие функциональные анализы, такие как проверка того, способно ли антитело нарушать или уменьшать образование фибрилл

ТТР, когда мономерный ТТР или промежуточные формы неправильно свернутого ТТР 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, оснащенный 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 ТТР и оставить их при комнатной температуре на 30 минут перед проведением измерений. Флюоресценцию тиофлавина-Т можно наблюдать с помощью спектрофлуориметра. Смотрите US 2014/0056904.

[0308] 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 ТТР или отложениями ТТР. К таким заболеваниям относятся типы амилоидоза ТТР, такие как: амилоидоз АТТР дикого типа (также называемый старческим системным амилоидозом, ССА), старческий сердечный амилоидоз (ССерА), наследственная амилоидная полинейропатия (НАП), наследственная амилоидная кардиомиопатия (НАК) и селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС). Подходящими признаками или симптомами, которые можно наблюдать, являются присутствие и избыток 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 ТТР амилоида у контрольных животных, которые получили контрольное антитело (например, контрольное антитело с подобранным изотипом), плацебо или вовсе не получали лечения. Иллюстративная животная модель для тестирования активности против амилоидоза ТТР представляет собой мышиную модель, несущую нуль-мутацию в эндогенном локусе *Ttr* мыши и человеческий мутантный ген *TTP*, содержащий мутацию V30M, которая связана с наследственной 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 наследственных вариантов амилоидоза ТТР и модели для спорадических вариантов амилоидоза ТТР. Смотрите, например, Teng *et al.*, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito and Maeda, *Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis, in Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions*, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Трансгенные животные могут содержать человеческий трансген ТТР, такой как трансген ТТР с мутацией, ассоциированной с амилоидозом ТТР, или трансген ТТР 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 гуманизированный вариант антитела будет эффективным, если соответствующее антитело мыши или химерное антитело будет эффективным в соответствующей животной модели, и гуманизированное антитело имеет сходную аффинность связывания (например, в пределах экспериментальной ошибки, например, при коэффициенте 1,5, 2 или 3).

[0309] Клинические испытания исследуют безопасность и эффективность для человека, имеющего заболевание, связанное с амилоидозом TTR.

I. Нуклеиновые кислоты

[0310] В изобретении дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из тяжелых и легких цепей, описанных выше (например, SEQ ID NO: 2, 4, 18, и 20). 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: 35 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 37 (легкая цепь), которые могут кодироваться SEQ ID NO: 36 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 38 (легкая цепь), соответственно. 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 большее количество векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, путем твердофазного синтеза или ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной сплошной нуклеиновой кислоты, например, внутри вектора экспрессии, или могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

J. Конъюгированные антитела

[0311] Конъюгированные антитела, специфически связывающиеся с антигенами, экспонированными в патогенных формах TTR, но не в нативной тетрамерной форме TTR, такими как аминокислотные остатки 89-97 (SEQ ID NO: 45) или аминокислотные остатки 101-109 (SEQ ID NO: 30) TTR, полезны для: обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTR; наблюдения и оценки

эффективности терапевтических агентов, используемых для лечения пациентов с диагнозом амилоидоз ТТР; ингибирования или снижения агрегации ТТР; ингибирования или уменьшения образования фибрилл ТТР; уменьшения количества или удаления отложений ТТР; стабилизации нетоксичных конформаций ТТР; или лечения или осуществления профилактики амилоидоза ТТР 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.

[0312] Конъюгированными терапевтическими фрагментами могут быть любыми агентами, которые могут быть использованы для лечения, борьбы, улучшения, предотвращения или улучшения нежелательной патологии или заболевания у пациента, например, амилоидоза ТТР. Терапевтические фрагменты могут включать в себя, например, иммуномодуляторы или любые биологически активные агенты, которые стимулируют или усиливают активность антитела. Иммуномодулятором может быть любой агент, которое стимулирует или ингибирует, развитие или поддержание иммунологического ответа. Если такие терапевтические фрагменты связаны с антителом, специфичным к мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам ТТР, таким как описанные в данном документе антитела, то присоединённые терапевтические фрагменты будут иметь специфическую аффинность к чужеродным патогенным формам ТТР по сравнению с нативной тетрамерной формой ТТР. Следовательно, введение конъюгированных антител непосредственно воздействует на ткани, содержащие патогенные формы ТТР, с минимальным повреждением окружающей нормальной здоровой ткани. Это может быть особенно полезно для терапевтических фрагментов, которые слишком токсичны для введения самих по себе. Кроме того, можно использовать меньшее количество терапевтических фрагментов.

[0313] Примеры подходящих терапевтических фрагментов включают в себя лекарственные средства, которые снижают уровни ТТР, стабилизируют нативную тетрамерную структуру ТТР, ингибируют агрегацию ТТР, разрушают фибриллы ТТР, 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); Johnson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 421(2-3): 185-203 (2012), Ueda and Ando, *Translational Neurodegeneration* 3:19 (2014), и Hawkins *et al.* *Annals of Medicine* 47:625-638 (2015)). Например, антитела могут быть конъюгированы с тафамидисом, дифлунизалом, AG10, ALN-ТТР01, ALNТТР02, антисмысловыми

олигонуклеотидами, такими как IONIS-TTPRx (инотерсен), миРНК, такими как патизиран или ревусиран, доксициклином (докси), таурорсодезоксихолевой кислотой (TUDCA), Doxy-TUDCA, циклодекстрином (CyD), 4'-йод-4'-дезоксидоксорубицином (IDOX), эпигаллокатехин галлатом (EGCG), куркумином, ресвератролом (3,5,4'-тригидроксистильбен), или антителами к компоненту сывороточного амилоида Р (SAP). Другие репрезентативные терапевтические фрагменты включают в себя другие агенты, которые, как известно, полезны для лечения, контроля или облегчения амилоидоза ТТР или симптомов амилоидоза ТТР. Смотрите, например, Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013) для информации по общеизвестным клиническим симптомам амилоидоза ТТР и типичным агентам, используемым для лечения таких симптомов.

[0314] Антитела также могут быть соединены с другими белками. Например, антитела могут быть соединены с финомерами (Fynomers). Финомеры 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. Финомеры могут быть сконструированы для связывания с целевыми молекулами с той же аффинностью и специфичностью, что и антитела. Они подходят для создания мультиспецифических гибридных белков на основе антител. Например, финомеры могут быть слиты с N-концевыми и/или C-концевыми концами антител для создания би- и триспецифических финомерных антител (FynomAb) с различными структурами. Финомеры могут быть подобраны с использованием библиотек финомеров, с помощью технологии скрининга с применением FACS, Biacore и клеточных анализов, которые позволяют эффективно отбирать финомеры с оптимальными свойствами. Примеры финомеров раскрыты 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).

[0315] Раскрытые в данном документе антитела также могут быть связаны или конъюгированы с одним или большим количеством других антител (например, для формирования гетероконъюгатов антител). Такие другие антитела могут связываться с различными эпитопами в ТТР или его части, или могут связываться с другим целевым антигеном. Такие анти-ТТР антитела, связывающиеся с эпитопами ТТР, отличными от таковых 9D5 или 18C5, могут включать в себя антитела, как в Таблице 3.

[0316] Антитела также могут быть соединены с детектируемой меткой. Такие антитела могут быть использованы, например, для диагностики амилоидоза ТТР, для мониторинга прогрессирования амилоидоза ТТР и/или для оценки эффективности лечения.

Такие антитела особенно полезны для выполнения такой детекции у субъектов, которые подвержены или могут быть подвержены амилоидозу ТТР, или в соответствующих биологических образцах, полученных из таких субъектов. Типичные обнаруживаемые метки, которые могут быть присоединены или прицеплены к антителу, раскрытые в данном документе, включают в себя: различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как стрептавидин, и авидин или биотин; флуоресцентные материалы, такие как умбеллиферон, флуорофори DyLight, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и аэкорин; радиоактивные материалы, такие как иттрий⁹⁰ (⁹⁰Y), радиосеребро-111, радиосеребро-199, висмут²¹³, йод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, и ¹¹⁷Tm; позитрон-излучающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий; нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов; и молекулы, которые радиоактивно мечены или конъюгированы с определенными радиоизотопами. Репрезентативные детектируемые метки, которые могут быть связаны или соединены с антителом, раскрытым в данном документе, включают в себя электрохемилюминесцентные метки, например MSD GOLD SULFOTAG NHS-Ester (SULFO-TAG) (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд).

[0317] Соединение 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 в себя 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).

[0318] Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы, прямо или косвенно через промежуточное звено (например, линкер), с мышинным, химерным, венированным, или гуманизированным антителом 9D5 или 18C5, применяя методы, известные в данной

области техники. Смотрите, например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); и Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Подходящие линкеры включают в себя, 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

[0319] Вышеуказанные антитела могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболевания у пациента, имеющего или имеющего риск заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, транстиретином (ТТР) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами ТТР. Хотя понимание механизмов не требуется для практического применения, считается, что любой или все из следующих механизмов могут способствовать лечению амилоидоза ТТР с использованием вышеуказанных антител: опосредованное антителом ингибирование агрегации и образования фибрилл ТТР, опосредованная антителом стабилизация нетоксичных конформаций ТТР (например, тетрамерных форм), или опосредованный антителом клиренс агрегированного ТТР, олигомерного ТТР или мономерного ТТР. Антитело-лекарственные конъюгаты могут иметь дополнительные механизмы действия, обусловленные конъюгированным фрагментом.

[0320] Антитела вводят эффективной схемой, что означает 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 нарушения, что подвергается лечению. Если пациент уже страдает от нарушения, 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.

[0321] Частота введения зависит от периода полужизни антитела в системе 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 нарушения, 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.

[0322] Количество вводимых доз зависит от того, является ли заболевание острым или хроническим, а также от ответа нарушения на лечение. При острых нарушениях или острых обострениях хронического нарушения часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одной болюсной дозы, необязательно в виде разделенной дозы, достаточно для острого нарушения или острого обострения хронического нарушения. Лечение может повторяться для рецидивов острого нарушения 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

[0323] В данном документе приведены несколько способов диагностики, мониторинга, лечения или осуществления профилактики заболеваний или патологий, опосредованных, по меньшей мере частично, транстиретином (ТТР) и, в частности, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами ТТР (например, амилоидоз ТТР). Примеры таких заболеваний включают наследственные амилоидозы ТТР, такие как наследственная амилоидная кардиомиопатия (НАК), наследственная амилоидная полинейропатия (НАП), или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС), и спорадические амилоидозы ТТР, такие как старческий системный амилоидоз (ССА) или старческий сердечный амилоидоз (ССерА). Антитела, описанные выше, могут быть включены в фармацевтическую композицию для

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

[0324] Фармацевтические композиции можно вводить профилактически лицам, имеющим известный генетический риск амилоидоза ТТР. 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 ТТР, связанные с амилоидозом ТТР), включая использование диагностических способов, представленных в данном документе. Например, в гене, кодирующем ТТР, более 100 мутаций, которые вовлечены в амилоидоз ТТР. 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).

[0325] Индивиды, страдающие от амилоидоза ТТР могут иногда быть распознаны по клиническим проявлениям амилоидоза ТТР, включая одно или большее количество из следующих: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) нейропатическая 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 атрио-вентрикулярный блок, особенно когда он сопровождается утолщенным сердцем; и б) включения в стекловидном теле по типу ваты. Смотрите Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Однако, окончательный диагноз амилоидоза ТТР обычно основывается на биопсии органов-мишеней с последующим гистологическим окрашиванием вырезанной ткани с помощью специфического к амилоиду красителя «конго красный». Если наблюдается положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание и масс-спектрометрическая идентификация ТТР, чтобы гарантировать, что белок-предшественник, ответственный за формирование амилоида, действительно является ТТР. Для наследственных форм заболеваний, необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем ТТР, до

постановки окончательного диагноза.

[0326] 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 ТТР в образцах плазмы, полученных от субъекта, по сравнению с контрольными образцами, как описано в примерах.

[0327] В соответствии с семейной историей, генетическим тестированием или медицинским скринингом на амилоидоз ТТР, лечение может быть начато в любом возрасте (например, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 лет). Лечение обычно влечет за собой многократное введение дозы в течение определенного периода времени и может контролироваться путем анализа антител или активированных ответов Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов на терапевтический агент (например, усеченную форму ТТР, содержащую аминокислотные остатки 89-97 или содержащую аминокислотные остатки 101-109) со временем. Если ответ снижается, требуется усиливающая его доза.

[0328] В профилактических применениях антитело или его фармацевтическую композицию вводят субъекту, восприимчивому к заболеванию или подверженному риску заболевания (например, амилоидозу ТТР), схемой (доза, частота и способ введения), эффективной для того, чтобы уменьшить риск, снизить тяжесть или задержать начало проявления по меньшей 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, амилоидоза ТТР), схемой (доза, частота и способ введения), эффективной чтобы улучшить или по меньшей мере воспрепятствовать дальнейшему ухудшению по меньшей мере одного признака или симптома заболевания.

[0329] 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, исследование фазы II, фазы II/III или фазы III), или на животной модели на уровне $p < 0,05$

или 0,01 или даже 0,001.

[0330] Эффективная схема лечения антителом может быть использована, например, для: ингибирования или уменьшения агрегации ТТР у субъекта, имеющего или подверженного риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; ингибирования или уменьшения образования фибрилл ТТР у субъекта, имеющего или подверженного риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; уменьшения количества или удаления отложений ТТР, или агрегированного ТТР у субъекта, имеющего или подверженного риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; стабилизации нетоксичных конформаций ТТР у субъекта, имеющего или подверженного риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; ингибирования токсических эффектов агрегатов, фибрилл или отложений ТТР у субъекта, имеющего или подверженного риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; диагностирования наличия или отсутствия накопления ТТР амилоидов в ткани, предположительно содержащей накопление амилоида; определения количества отложений ТТР у субъекта путем обнаружения наличия связанного антитела у субъекта после введения антитела; обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР у субъекта; мониторинга и оценки эффективности терапевтических агентов, используемых для лечения пациентов с диагнозом ТТР амилоидоз; индуцирования иммунного ответа, включающего в себя антитела к ТТР у субъекта; задержки начала патологии, связанной с накоплением ТТР амилоида у субъекта; или лечения, или осуществления профилактики амилоидоза ТТР у пациента.

[0331] Эффективные дозы варьируются в зависимости от многих различных факторов, таких как способ введения, целевая локализация, физиологическое состояние субъекта, независимо от того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

[0332] 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 присутствует, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и является ли заболевание острым или хроническим, среди прочих факторов.

[0333] 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 охватывает введение несколькими дозами в течение длительного периода, например по

меньшей мере в течение шести месяцев. Дополнительные иллюстративные схемы лечения охватывают введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз каждые 3-6 месяцев.

[0334] Антитела могут вводиться периферическим путем. Пути введения включают в себя 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, агенты вводят непосредственно в определенную ткань, где накапливаются отложения, например, путем внутричерепной инъекции.

[0335] 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 единицы дозы готовой формы (то есть дозы для одного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или большего количества физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей 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. В альтернативном варианте, антитела могут быть в лиофилизированной форме для разбавления перед использованием подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой.

[0336] Введение по схемам может осуществляться в комбинации с, одновременно с, или последовательно с другими агентами, эффективными для лечения или профилактики заболевания, подлежащего лечению. Такие вещества могут включать в себя миРНК для ингибирования экспрессии ТТР, или Vyndaqel, стабилизатора ТТР в тетрамерной форме. Такие агенты могут включать в себя стабилизаторы тетрамера ТТР, например тафамид или дифлунизал (смотрите, например, WO2011116123, патент США № 9150489), генную терапию для подавления экспрессии ТТР, например антисмысловые олигонуклеотиды, такие как IONIS-TTPRx (инотерсен) (смотрите, например, патенты США № 8101743, 8697860, 9061044 и 9399774; патент Японии № JP5896175) или миРНК, например

патизирован или ревуцирован (смотрите, например, WO2016033326), соединения, разлагающие амилоид, такие как доксициклин (докси), тауроурсодеоксихолевая кислота (ТУДХК), докси-ТУДХК, циклодекстрин (CyD), 4'-йод-4'-дезоксидоксорубин (ЙДОК) или антитела к компоненту сывороточного амилоида Р (SAP).

[0337] Другой агент, эффективный для лечения или профилактики заболевания, подлежащего лечению, может быть введен субъекту, которого ранее лечили антителом, раскрытым в данном документе. Субъект, которого лечили другим агентом, эффективным для лечения или профилактики заболевания, которое лечат, может больше не получать лечение антителом, раскрытым в данном документе.

[0338] Лечение антителами, раскрытыми в данном документе, может сочетаться с другими способами лечения, эффективными против нарушения, которое лечат. Комбинированные препараты могут быть приготовлены вместе или вводиться отдельно. Некоторые примеры, полезных для комбинированной терапии, включают в себя анти-ТТР антитело, которое связывается с эпитопом, отличным от эпитопа 9D5 или 18C5, например антитело, раскрытое в Таблице 3.

[0339] После лечения, состояние субъекта может быть оценено для определения прогресса или эффективности такого лечения. Такие способы предпочтительно проверяют изменение количества амилоида ТТР или количества ненативных форм ТТР. Например, количества амилоида ТТР могут быть оценены для определения улучшения по сравнению с количествами амилоида ТТР у субъекта при сравнимых обстоятельствах до лечения. Количество амилоида ТТР 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.

[0340] Количество амилоида ТТР могут быть измерены с помощью ряда способов, включая методы визуализации. Примеры подходящих методов визуализации включают в себя ПЭТ-сканирование с помощью радиоактивно меченого ТТР или его фрагментов, антител к ТТР или их фрагментов, визуализирующих амилоид основанных на красителе «конго красный» 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 «конго красным», Wall *et al.*, Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting), и других меток ПЭТ. Уровни ненативных форм ТТР могут быть измерены, например, путем анализа ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинг или плашковым анализом Meso Scale Discovery с антителами, описанными в данном документе, на образцах плазмы или образцах биопсии из субъекта, при сравнении с контрольными образцами, как описано в примерах.

A. Способы диагностики и мониторинга

[0341] Также предложены способы обнаружения иммунного ответа против ТТР у пациента, страдающего или подверженного заболеваниям, связанным с отложениями ТТР или патогенными формами ТТР (например, мономерными, неправильно свернутыми, агрегированными или фибрильными формами ТТР). Способы могут использоваться для контроля курса терапевтического и профилактического лечения с помощью предлагаемых в данном документе агентов. Профиль антител после пассивной иммунизации обычно показывает непосредственный пик концентрации антител с последующим экспоненциальным разрушением. Без дополнительной дозы распад приближается к предшествующим уровням в период от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от периода полужизни вводимого антитела. Например, период полужизни некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

[0342] В некоторых способах перед введением проводят измерение исходного уровня антитела к ТТР у субъекта, вскоре после этого проводится второе измерение для определения пикового уровня антитела, и проводят одно или большее количество дополнительных измерений с интервалами, для мониторинга уменьшения количества антител. Когда уровень антитела снизился до исходного уровня или заданного процента от пика меньше исходного уровня (например, 50%, 25% или 10%), предписывают введение дополнительной дозы антитела. В некоторых способах, пиковые уровни или измеренные после них уровни меньше исходного, сравнивают с эталонными уровнями, определенными до этого, чтобы составить целесообразную профилактическую или терапевтическую схему лечения для других пациентов. Если измеренный уровень антител значительно меньше контрольного уровня (например, меньше среднего минус одно или, предпочтительно, два стандартных отклонения контрольного значения в популяции субъектов, получающих пользу от лечения), предписывают введение дополнительной дозы антитела.

[0343] Также предложены способы обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной, или фибрильной форм ТТР у субъекта, например, путем измерения амилоида ТТР или патогенных форм ТТР (например, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР). Такие способы полезны для

диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с такими патогенными формами ТТР (например, амилоидоза ТТР) или восприимчивостью к ним. Также могут быть использованы способы для бессимптомных субъектов. Наличие мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм ТТР указывает на восприимчивость к будущему симптоматическому заболеванию. Эти способы также полезны для наблюдения за прогрессированием заболевания и/или ответом на лечение у пациентов, у которых ранее был диагностирован амилоидоз ТТР.

[0344] Биологические образцы, полученные от субъекта, подозреваемого в наличии или имеющего риск амилоидоза ТТР, могут быть приведены в контакт с антителами, раскрытыми в данном документе, для оценки присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР. Например, уровни мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР у таких субъектов можно сравнить с уровнями, характерными для здоровых людей. В альтернативном варианте, уровни амилоида ТТР или патогенных форм ТТР (например, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР) у таких субъектов, получающих лечение по заболеванию, можно сравнить с таковыми пациентов, которые не лечились от амилоидоза ТТР. Некоторые такие тесты включают в себя биопсию ткани, полученную из таких субъектов. Также могут использоваться анализы ИФА, например, для оценки уровней мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР в образцах жидкости. Некоторые такие анализы ИФА включают в себя применение анти-ТТР антител, предпочтительно связывающих мономерную, неправильно свернутую, агрегированную или фибрильную формы ТТР по отношению к нормальной тетрамерной форме ТТР.

[0345] Некоторые такие анализы представляют собой сэндвич-иммуноанализы. В некоторых таких иммуноанализах используется электрохемилюминесцентная платформа Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). В некоторых таких иммуноанализах используют электрохемилюминесцентные метки на репортерных антителах, например, в анализах MSD (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). Например, репортерное антитело может быть помечено меткой SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). Плашки, используемые в электрохемилюминесцентных анализах, могут содержать электроды, например, плашки MSD (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). Плашки, используемые в электрохемилюминесцентных анализах, могут содержать электроды в нижней части каждой лунки (например, плашки MSD (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд)). В некоторых анализах используется меченое захватывающее антитело. Например, меченое захватывающее антитело может

представлять собой 9D5 или 18C5, или его гуманизированный, химерный или венерованный вариант. В некоторых анализах, используются меченые репортерные антитела. Например, меченое репортерное антитело может представлять собой 9D5 или 18C5, или его гуманизированный, химерный или венерованный вариант. Меченое репортерное антитело также может представлять собой антитело из Таблицы 3, или его гуманизированный, химерный или венерованный вариант. Меченое репортерное антитело может представлять собой антитело, которое связывается с ТТР без конформационной специфичности. В одном варианте осуществления, антитело, которое связывается с ТТР без конформационной специфичности, может представлять собой 8C3 или 7G7, или его гуманизированный, химерный или венерованный вариант (смотрите, например, WO 2016/120811). В одном варианте осуществления, антитело, которое связывается с ТТР без конформационной специфичности, может представлять собой поликлональное антитело. В одном варианте осуществления, поликлональное антитело представляет собой поликлональное кроличье анти-человеческий преальбумин антитело (кат. № A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния). В одном варианте осуществления, поликлональное кроличье анти-ТТР-антитело представляет собой Sigma, кат. № HPA002550 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури),

[0346] Некоторые анализы обнаруживают все неправильно свернутые ТТР в образце (то есть все неправильно свернутые формы ТТР, включая мономеры и мультимеры). Другие анализы специально обнаруживают мономерный неправильно свернутый ТТР, или мультимерный неправильно свернутый ТТР. Другие анализы обнаруживают все формы ТТР (неправильно свернутые формы и нативную тетрамерную форму). В некоторых таких анализах используют захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, или эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; причем, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и при этом обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР, если таковой присутствует, указывает на присутствие или отсутствие всех неправильно свернутых форм ТТР, присутствующих в образце. Такие репортерные антитела могут включать в себя 18C5, 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант. Такие репортерные антитела могут включать в себя антитело, которое связывается в пределах остатков 89-97, 101-109, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127,

80-127, 90-127, 100-127, 110-127 или 115-127 ТТР. Такие репортерные антитела могут включать в себя 8С3 или 7G7 (смотрите, например, WO 2016/120811). Такие репортерные антитела могут включать в себя поликлональное кроличье анти-человеческий преальбумин антитело (кат. № А000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния), или поликлональное кроличье анти-ТТР антитело (Sigma, кат. № НРА002550, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Некоторые такие анализы обнаруживают неправильно свернутые формы ТТР в биологическом образце из пациентов с наследственным амилоидозом ТТР, являющихся носителями мутации в позиции 89 в пределах 9D5 эпитопа ТТР. Иллюстративные мутации представляют собой Е89К ТТР и Е89Q ТТР. В некоторых таких анализах используются захватывающее антитело 9D5 и поликлональное анти-ТТР репортерное антитело, или 18С5-репортерное антитело.

[0347] Некоторые анализы обнаруживают мультимерные формы неправильно свернутого ТТР в образце. Такие анализы могут быть сконфигурированы для обнаружения мультимерного неправильно свернутого ТТР предпочтительно или исключительно по сравнению с мономерным неправильно свернутым ТТР. В некоторых таких анализах используют захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР. Такая комбинация захватывающего и репортерного антитела может связываться преимущественно или исключительно с мультимерным ТТР по сравнению с мономерным, поскольку множество копий ТТР обеспечивают множество эпитопов для связывания антител. Обнаружение связывания репортерного антитела с мультимерным неправильно свернутым ТТР, если таковой присутствует, указывает на наличие или отсутствие мультимерного неправильно свернутого ТТР. В некоторых таких анализах, репортерное антитело конкурирует за связывание с ТТР с захватывающим антителом, и/или репортерное и захватывающее антитело связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом ТТР. В некоторых таких анализах, захватывающее антитело связывается с первой неправильно свернутой молекулой ТТР в мультимерном неправильно свернутом ТТР, а репортерное антитело связывается с второй неправильно свернутой молекулой ТТР в мультимерном неправильно свернутом ТТР. Конкуренция за связывание между захватывающим и репортерным антителами исключает или, по меньшей мере, уменьшает (в зависимости от того, является ли конкуренция результатом перекрывающихся эпитопов или стерических ограничений) одновременное связывание и обнаружение мономерного неправильно свернутого ТТР. В некоторых таких анализах, обнаружение связывания репортерного антитела, которое связывается с второй неправильно свернутой молекулой ТТР в

мультимерном ТТР, указывает на присутствие или отсутствие мультимерного неправильно свернутого ТТР.

[0348] Раскрытые в данном документе антитела могут быть использованы в способе определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстиретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце. Первая часть биологического образца может быть проанализирована на предмет всех неправильно свернутых ТТР в образце (то есть всех неправильно свернутых форм ТТР, включая мономеры и мультимеры) в первом анализе, в котором обнаружены мономерные неправильно свернутые и мультимерные неправильно свернутые ТТР. В первом анализе можно использовать захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР. Если в образце присутствует неправильно свернутый ТТР, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс. Обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР, если таковой присутствует, указывает на присутствие или отсутствие неправильно свернутого ТТР в образце. Вторая часть биологического образца может быть проанализирована на предмет мультимерных форм неправильно свернутого ТТР в биологическом образце во втором анализе, который обнаруживает мультимерный неправильно свернутый ТТР, предпочтительно по сравнению с мономерным неправильно свернутым ТТР. Во втором анализе можно использовать захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР. Если в образце присутствует мультимерный неправильно свернутый ТТР, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс. Захватывающее и репортерное антитело могут связываться одновременно преимущественно или исключительно с мультимерным неправильно свернутым ТТР, если таковой присутствует, чтобы выявить наличие или отсутствие мультимерного неправильно свернутого ТТР. В некоторых таких анализах, репортерное антитело конкурирует за связывание с ТТР с захватывающим антителом, или связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и захватывающее антитело. В некоторых таких анализах, захватывающее антитело связывается с первой неправильно свернутой молекулой ТТР в мультимерном неправильно свернутом ТТР, а репортерное антитело связывается с второй неправильно свернутой молекулой ТТР в мультимерном неправильно свернутом ТТР. Конкуренция за связывание

между захватывающим и репортерным антителами исключает или, по меньшей мере, уменьшает (в зависимости от того, является ли конкуренция результатом перекрывающихся эпитопов или стерических ограничений) одновременное связывание и обнаружение мономерного неправильно свернутого ТТР. В некоторых таких анализах, обнаружение связывания репортерного антитела, которое связывается с второй неправильно свернутой молекулой ТТР в мультимерном ТТР, указывает на присутствие или отсутствие мультимерного неправильно свернутого ТТР. В некоторых анализах, рассчитывают соотношение мультимерного неправильно свернутого ТТР и всех неправильно свернутых ТТР.

[0349] Раскрытые в данном документе антитела также можно использовать в способе определения соотношения уровня всех неправильно свернутых ТТР и совокупного ТТР (неправильно свернутые формы и нативная тетрамерная форма) в биологическом образце. Первая часть биологического образца может быть проанализирована на предмет всех неправильно свернутых ТТР в образце (то есть всех неправильно свернутых форм ТТР, включая мономеры и мультимеры) в первом анализе, в котором обнаружены мономерные неправильно свернутые и мультимерные неправильно свернутые ТТР. В первом анализе можно использовать захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР. Если в образце присутствует неправильно свернутый ТТР, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс. Обнаружение связывания репортерного антитела с неправильно свернутым ТТР, если таковой присутствует, указывает на наличие или отсутствие неправильно свернутого ТТР в образце. Вторая часть биологического образца может быть проанализирована на предмет совокупного ТТР (неправильно свернутые формы и нативная тетрамерная форма) во втором анализе, в котором обнаруживают совокупный ТТР. Во втором анализе можно использовать захватывающее антитело, которое связывается с ТТР без конформационной специфичности, и репортерное антитело, которое связывается с ТТР без конформационной специфичности. Если ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с ТТР, формируя сэндвич-комплекс. Обнаружение связывания репортерного антитела с ТТР, если таковой присутствует, указывает на присутствие или отсутствие ТТР, присутствующего в образце. Может быть рассчитано соотношение всех неправильно свернутых ТТР и совокупного ТТР (неправильно свернутые формы и нативная тетрамерная форма).

[0350] Способы визуализации *in vivo* могут работать путем введения реагента,

такого как антитело, которое связывается с мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами ТТР в субъекте, а затем обнаружения реагента после того, как он связался. Такие антитела обычно связываются с эпитопом в пределах остатков 89-97 или 101-109 ТТР. При желании, реакции устранения можно избежать с использованием фрагментов антител, не имеющих полноразмерной константной области, таких как Fab. В некоторых способах, одно и то же антитело может служить как лечебным, так и диагностическим реагентом.

[0351] Диагностические реагенты могут быть введены в организм субъекта путем внутривенной инъекцией, или другими путями, которые считаются разумными. Доза реагента должна быть в тех же пределах, что и для способов лечения. Как правило, реагент метят, хотя в некоторых способах первичный реагент с аффинностью к мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам ТТР является немеченым, а вторичный меченный реагент используется для связывания с первичным реагентом. Выбор метки зависит от способа обнаружения. Например, флуоресцентная метка подходит для оптического обнаружения. Использование парамагнитных меток подходит для томографического обнаружения без хирургического вмешательства. Радиоактивные метки также могут быть обнаружены с использованием ПЭТ или ОФЭКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии).

[0352] Диагностика выполняется путем сравнения количества, размера и/или интенсивности помеченных локусов с соответствующими исходными значениями. Исходные значения могут представлять собой средние уровни в популяции неподверженных заболеванию индивидов. Исходные значения также могут представлять собой предыдущие уровни, определенные в одном и том же субъекте. Например, исходные значения могут быть определены у субъекта до начала лечения, а затем измеренные значения сравнивают с исходными значениями. Снижение значений относительно исходного уровня обычно сигнализирует о положительном ответе на лечение.

[0353] Наблюдение за изменением количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, связывания анти-ТТР антитела, и т. п. позволяет корректировать схему лечения согласно ответу на лечение. Затем может быть определено, следует ли корректировать лечение, и, если необходимо, можно корректировать лечение согласно наблюдению. Значительное изменение означает, что сравнение значения параметра после лечения относительно исходного обеспечивает некоторые доказательства того, что лечение привело или не привело к положительному эффекту. В некоторых случаях, изменение значений параметра у самого пациента свидетельствует о том, что лечение привело или не привело к

положительному эффекту. В других случаях, изменение значений, если они есть, у пациента, сравнивают с изменением значений, если они есть, в репрезентативной контрольной группе пациентов, не проходящих лечение. Различие в ответе у конкретного пациента от нормального ответа у контрольного пациента (например, среднее плюс отклонение от среднеквадратичного отклонения) также может служить доказательством того, что схема лечения обеспечивает или не обеспечивает положительный эффект для пациента. Изменения в вышеприведенных параметрах ТТР могут также сочетаться с другими изменениями в показателях или симптомах, таких как побочные эффекты при определении необходимости и способа корректировки лечения.

[0354] У некоторых пациентов, наблюдение показывает, что количество неправильно свернутого ТТР, мультимерно неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, или связывание анти-ТТР антитела является таким же или большим, чем было обнаружено ранее. У таких пациентов, если нет никаких неприемлемых побочных эффектов, схема лечения может быть продолжена как есть, или даже увеличена частота введения и/или доза, в случае если уже не достигнута максимальная рекомендуемая доза.

[0355] У некоторых пациентов, наблюдение указывает на обнаруживаемое снижение количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, связывания анти-ТТР антитела и т. п., но такое количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, или связывание анти-ТТР антитела остается выше нормы. У таких пациентов, если нет никаких неприемлемых побочных эффектов, схема лечения может быть продолжена как есть, или даже увеличена частота введения и/или доза, в случае если уже не достигнута максимальная рекомендуемая доза. В альтернативном варианте, у некоторых таких пациентов схема лечения может быть прекращена и заменена лечением другими агентами, такими как стабилизатор тетрамерного ТТР, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтический агент на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклин плюс таурурсодезоксихолевая кислота.

[0356] Если наблюдение указывает на то, что количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, связывание анти-ТТР антитела или т. п. у пациента, уже было снижено до уровня или до близко нормального уровня количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, связывания анти-ТТР антитела, схема лечения может быть скорректирована с индукции (т. е., которая уменьшает уровень количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложенный транстиретина, или связывания анти-ТТР антитела) на поддержание (т. е., которая

поддерживает количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, или связывания анти-ТТР антитела на примерно постоянном уровне). Такая схема может быть осуществлен путем снижения дозы и/или частоты введения лечения. В альтернативном варианте, у некоторых таких пациентов схема лечения может быть прекращена и заменена лечением другими агентами, такими как стабилизатор тетрамерного ТТР, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтический агент на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклин плюс таурурсодезоксихолевая кислота.

[0357] У других пациентов, наблюдение может указывать на то, что схема лечения оказывает некоторый положительный эффект, но неоптимальный эффект. Оптимальный эффект может быть определен как процент уменьшения количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, или связывания анти-ТТР антитела в верхней половине или квинтиле изменения количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, связывания анти-ТТР антитела, которое наблюдается в репрезентативной выборке пациентов, находящихся на схеме лечения в определенный момент времени после начала терапии. Пациент с меньшим снижением или пациент, у которого количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, или связывание анти-ТТР антитела остается постоянным или даже увеличивается, но в меньшей степени, чем ожидалось, при отсутствии применения схемы лечения (например, из вывода по контрольной группе пациентов, которым не назначена схема лечения), можно классифицировать как испытывающих положительный, но неоптимальный ответ. Такие пациенты могут необязательно подвергаться корректировке схемы, в которой увеличивают дозу и/или частоту введения агента. В альтернативном варианте, или дополнительно, если корректировка в сторону увеличения не приводит к улучшению ответа, для некоторых таких пациентов схема лечения может быть прекращена и заменена лечением другими агентами, такими как стабилизатор тетрамерного ТТР, терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтический агент на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклин плюс таурурсодезоксихолевая кислота.

[0358] У некоторых пациентов, количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, или связывания анти-ТТР антитела может увеличиваться аналогично или более значительно по сравнению с неправильно свернутым ТТР, мультимерным неправильно свернутым ТТР, отложениями транстиретина, или связыванием анти-ТТР антитела у пациентов, не получающих лечение.

Если такие увеличения сохраняются в течение определенного периода времени, при желании лечение может быть прекращено в пользу лечения одним или большим количеством других агентов.

[0359] Диагностические способы с антителами, раскрытыми в данном документе, могут быть выполнены в комбинации с вторым анти-ТТР антителом, которое связывает эпитоп, отличный от эпитопа 9D5 или 18C5, например антителом, раскрытым в Таблице 3.

[0360] Раскрытые в данном документе анализы также могут быть использованы для оценки связывания цели (фармакодинамические эффекты) - несвязанного (свободного) неправильно свернутого ТТР в биологическом образце из субъекта, антителом, которое используется или исследовалось для использования в лечении. Такое антитело в данном анализе упоминается как исследуемое антитело, потому что оно исследуется на предмет его связыванием с целью. В данном анализе биологический образец может представлять собой аликвоту большего образца, называемого собранным образцом, так что анализ может проводиться параллельно для множества аликвот собранного образца. Исследуемое антитело конкурирует с захватывающим антителом (или, в альтернативном варианте, с репортерным антителом) за связывание с ТТР. Исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и захватывающее антитело (или репортерное антитело). Описанный выше сэндвич-анализ может проводить параллельно для первой и второй аликвот собранного образца, которые обычно имеют одинаковый объем. Одна аликвота дополняется исследуемым антителом, и обе аликвоты дополняются захватывающим и репортерным антителом. В аликвоте без исследуемого антитела обнаружение репортерного антитела как части «сэндвича» обеспечивает выявление наличия и количества неправильно свернутого ТТР в образце. В аликвоте с исследуемым антителом обнаружение уменьшенного количества репортерного антитела как части «сэндвича» относительно аликвоты без исследуемого антитела указывает на то, что исследуемое антитело связывается с неправильно свернутым ТТР и, следовательно, конкурирует либо с захватывающим, либо с репортерным антителом, и уменьшает формирование «сэндвича» между захватывающим антителом, неправильно свернутым ТТР и репортерным антителом. Такой анализ может быть выполнен на дополнительных аликвотах, содержащих увеличивающиеся количества исследуемого антитела (а также захватывающего антитела), дополнительно для характеристики связывания исследуемого антитела с неправильно свернутым ТТР. Образец может быть из субъекта с амилоидозом ТТР. Образец может быть из субъекта с наследственным амилоидозом ТТР. Субъект с наследственным амилоидозом ТТР может быть носителем мутации, выбранной из группы, состоящей из: V30M, Y114C, G47R, S50I, E61L, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q и V122I. В некоторых таких анализах,

биологический образец представляет собой образец плазмы. В некоторых таких анализах, анализ проводят с захватывающим антителом 9D5 или 18C5, и поликлональным анти-ТТР репортерным антителом. Такой анализ может быть использован для информирования о связывании с целью в клинических испытаниях антитела, предназначенного для терапевтического применения, как описано в данном документе. В некоторых таких анализах, исследуемое антитело представляет собой 14G8, и анализ проводят с захватывающим антителом 9D5 или 18C5, и поликлональным анти-ТТР репортерным антителом.

[0361] Раскрытые в данном документе анализы могут быть использованы для измерения фармакодинамических эффектов терапии, нацеленной на неправильно свернутые формы ТТР. В некоторых таких анализах, целевое связывание несвязанного (свободного) н-свер-ТТР в биологическом образце измеряют после *ex-vivo* обработки (внесения в) биологического образца *ex vivo* исследуемым антителом. Раскрытые в данном документе анализы также могут быть использованы для измерения эффективности исследуемого антитела у пациента. Биологические образцы собирают у пациента до и после лечения исследуемым антителом. В некоторых таких анализах, целевое связывание несвязанного (свободного) н-свер-ТТР в биологическом образце измеряют до и после лечения *in vivo* пациента исследуемым антителом. В некоторых анализах, цель исследуемого антитела представляет собой эпитоп в пределах остатков 89-97 ТТР. В некоторых анализах, цель исследуемого антитела представляет собой эпитоп в пределах остатков 101- 109 ТТР.

[0362] Данные способы также позволяют отличать транстиретин-опосредованный амилоидоз от не-амилоидоза ТТР, например, амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ), также известного как первичный системный амилоидоз.

IX. Наборы

[0363] В изобретении дополнительно предложены наборы (например, контейнеры), содержащие антитела 9D5 или 18C5, раскрытые в данном документе, и связанные с ним материалы, такие как инструкции для использования (например, вкладыш в упаковке). Инструкции по применению могут содержать, например, инструкции для введения антител, и, необязательно, одно или большее количество дополнительных агентов. Контейнеры с антителами могут быть в форме одиночных доз, упаковки доз (например, упаковок с множеством доз) или суб-единичных доз.

[0364] 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.

[0365] Наборы могут также содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он также может содержать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

X. Другие применения

[0366] Антитела могут быть использованы для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм транстиретина (ТТР) или их фрагментов в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Например, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР в биологическом образце в качестве индикатора того, что биологический образец содержит отложения амилоида ТТР. Связывание антител с биологическим образцом можно сравнить со связыванием антител с контрольным образцом. Контрольный образец и биологический образец могут содержать клетки того же самого тканевого происхождения. Контрольные образцы и биологические образцы могут быть получены от тех же или разных лиц, и в том же отборе проб или в разных отборах проб. При желании множество биологических образцов и множество контрольных образцов оценивают при многочисленных отборах проб, чтобы избежать случайного отклонения, независимого от различий между образцами. Затем может быть проведено прямое сравнение между биологическим образцом(-ами) и контрольным образцом (-ами), чтобы определить, увеличивается ли, уменьшается ли, или остается таким же связывание антитела (т. е. присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР) с биологическим образцом(-ами) относительно связывания антитела с контрольным образцом(-ами). Повышенное связывания антитела с биологическим образцом(-ами) по сравнению с контрольным образцом(-ами) указывает на присутствие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР в биологическом образце(-ах). В некоторых случаях повышенное связывания антитела является статистически значимым. Необязательно, связывание антитела с биологическим образцом является по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз или в 100 раз более сильным, чем связывание антитела с контрольным образцом.

[0367] Кроме того, антитела могут быть использованы для обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм

ТТР в биологическом образце для наблюдения и оценки эффективности терапевтического агента, что применяется для лечения пациента с диагностированным амилоидозом ТТР. Оценивают биологический образец из пациента с диагнозом амилоидоз ТТР, чтобы установить исходный уровень связывания антител с образцом (т. е. исходный уровень наличия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР в образце) перед началом терапии терапевтическим агентом. В некоторых случаях, множество биологических образцов из пациента оцениваются при множестве отборов проб, чтобы установить как исходное значение, так и меру случайного отклонения, не зависящего от лечения. Затем терапевтический агент вводят согласно схеме приема лекарства. Схема может включать в себя множество введений агента в течение определенного периода времени. Необязательно, связывание антител (т. е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР) оценивается при множественном отборе проб по множеству биологических образцов из пациента, как для определения меры случайного отклонения, так и для демонстрации тенденции в ответ на иммунотерапию. Затем сравнивают различные оценки связывания антитела с биологическими образцами. Если будут сделаны только два оценивания, можно провести прямое сравнение между двумя оцениваниями, чтобы определить, увеличилось ли, уменьшилось ли или оставалось неизменным связывание антитела между двумя оцениваниями (т.е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР). Если проведено больше чем два измерения, измерения могут быть проанализированы как период действия, начинающийся до лечения терапевтическим агентами, и длящийся все время терапии. Для пациентов, у которых уменьшилось связывание антител с биологическими образцами (т. е. наличие мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР), можно сделать вывод, что терапевтический агент был эффективным в лечении амилоидоза ТТР 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 амилоидоза ТТР.

[0368] Антитела также могут быть использованы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований, для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР 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 анализа

обнаружения. Антитела также могут быть использованы для очистки мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР, или партнеров по связыванию мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм ТТР, например, с помощью аффинной хроматографии.

[0369] Антитела также могут быть использованы для ингибирования или уменьшения агрегации ТТР, ингибирования или уменьшения формирования фибрилл ТТР, уменьшения или устранения отложений ТТР или агрегатов ТТР, или стабилизации нетоксичных конформаций ТТР 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, брюшного жира, или желудочно-кишечного тракта). В некоторых случаях агрегация ТТР, образование фибрилл ТТР, или отложения ТТР 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. Смотрите, также US 2014/0056904.

[0370] 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 отдельно указан, чтобы быть включенным посредством ссылки. Если в разное время с номером доступа ассоциированы разные варианты последовательности, то под этим номером доступа подразумевается вариант, ассоциированный с ним на момент действительной даты подачи настоящей заявки. Действительная дата подачи означат наиболее раннюю действительную дату подачи или дату подачи приоритетной заявки со ссылкой на номер доступа 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 данное 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. Материалы и приготовление реагентов

Таблица 4

Материалы и реагенты для анализа

Наименование	Описание	Лот/Партия/кат. №	Поставщик
14G8 мыши	2,95 мг/мл в 1хФСБ	PB-0334	Prothena
Козье анти-мышиный IgG антитело	Конъюгировано с IRDye 800CW, восстановлено в 0,5 мл H ₂ O	Кат. 925-32210	LI-COR
ч14G8	49,4 мг/мл в буфере для приготовления (25 mM гистидина, 230 mM трегалозы, 0,02% полисорбата 20, pH 6,5)	PNA PRX004 MSR01 DS02	Rentschler
Нейтравидин	10 мг флакон восстановленны й в воде, затем разбавленный до 1 мг/мл в ФСБ	Кат. 31000	ThermoFisher r Scientific
Гуанидиновый стандарт н-свер-ТТР	1 мг/мл ТТР дикого типа в 6M гуанидина HCl 1хФСБ	PB-0216	Prothena
9D5 анти-н-свер-ТТР-биотин мАт	1 мг/мл	PS021017D	Prothena
Кроличье анти-челТТР-SULFO-TAG	1 мг/мл	PS022317A	Prothena

поликлональное Ат (Dako)			
Набор ИФА для преальбумина (ТТР) человека	Измеряет совокупный ТТР человека	Кат. АВ 108895	Abeam
SULFO-TAG-мышинное-анти-н-свер-ТТ Р, клон 18С5		PВ-0386, конъюгат лот № 01302017ST-JM L	Prothena

Кат. = каталог; Чел = человеческий; мАт = моноклональное антитело; MSD = Meso Scale Discovery; ТТР = транстиретин; н-свер-ТТР = неправильно свернутый ТТР; ST = SULFO-TAG; ФСБ = фосфатно солевой буфер рН 7,4.

[0371] Приготовления реагентов

[0372] Биотинилирование 9D5: 1 мг/мл 9D5 в ФСБ биотинилировали в соответствии с инструкциями производителя, за исключением 10 М избытка NHS-биотина (Thermo-Fisher кат. № 21329) по отношению к антителу, который использовали вместо 20 М избытка.

[0373] SULFO-TAG кроличьего анти-ТТР пАт: Антитело (кат. № A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния) разбавляли до 1 мг/мл в ФСБ, а затем обессоливали, используя спин-колонку Zeba (ThermoFisher Scientific). Добавляли 50 мкл холодной H₂O к SULFO-TAG для восстановления, а затем материал встряхивали. Добавляли 2,2 мкл восстановленного SULFO-TAG к 50 мкл разведенного антитела, встряхивали, инкубировали 2 часа при комнатной температуре и хранили в темноте при 4С.

[0374] Приготовление стандарта гуанидин HCl неправильно свернутого ТТР: Денатурированный человеческий ТТР готовили путем инкубации 1 мг/мл очищенного рекомбинантного человеческого ТТР дикого типа в 1хФСБ, содержащего 6М гуанидин гидрохлорида, в течение 24 часов при 4 °С, затем разделяли на аликвоты и замораживали при -70 °С.

Пример 2. Способ ЭХЛ для определения свободного неправильно свернутого ТТР в плазме.

[0375] Свободный (несвязанный) неправильно свернутый ТТР, включая мономер, обнаруживали в плазме человека с использованием способа исследования количественного

анализа ЭХЛ (Meso Scale Discovery; MSD). 96-луночную MSD-плашку покрывали 30 мкл/лунка 4 мкг/мл нейтравидина в ФСБ, инкубировали в течение ночи при 4 °С, и трижды промывали в TBS, содержащем 0,05% Tween 20. Плашки имели сайты неспецифического связывания, блокированные 3% «Блокатором А» MSD (MSD кат. № R93BA-4) в ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием, затем трижды промывали. 30 мкл 1 мкг/мл биотинилированного 9D5 в буфере для анализа (1% MSD «Блокатор А»/ФСБ + 0,05% Tween-20) добавляли в каждую лунку и инкубировали 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. Стандартную кривую получали из свежей аликвоты ТТР в 6М гуанидин HCl, разведенной в «Разбавителе 2» (MSD кат. № R51BB-3). Стандартная кривая состояла из семи 4-кратных разведений, начиная с 200 нг/мл и заканчивая 49 пг/мл. Плазму пациента или контроля разбавляли 1:5 в «Разбавителе 2» MSD. Стандартную или разбавленную плазму (30 мкл) добавляли в плашки в двух повторностях, инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 2 часов, с последующим промыванием. 30 мкл поликлонального анти-ТТР с меткой SULFO-TAG (кат. № A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния) в концентрации 1 мкг/мл в буфере для анализа добавляли в каждую лунку, инкубировали 1 час со встряхиванием, с последующим промыванием. 150 мкл/лунка 1X «Буфера считывания Т» MSD (MSD кат. № R92TC-1) добавляли в каждую лунку и считывали в течение 10 минут на MSD Sector Imager S600. Верхний и нижний стандарты были опорными точками, и кривая имела количественный диапазон в чистой плазме от 1 до 500 нг/мл эквивалентов на основе стандарта гуанидин-HCl ТТР.

Пример 3. Биоанализ свободного неправильно свернутого ТТР в плазме пациента с амилоидозом ТТР

[0376] Индивидуальные и средние уровни свободного неправильно свернутого ТТР (нг-экв/мл) в плазме пациента с амилоидозом ТТР и нормы, объединенные из двух случаев анализа, показаны на Фиг. 1.

[0377] Результаты показаны на Фиг. 1. Первый столбец (обозначенный «нас-АТТР асимптом.») иллюстрирует результаты для бессимптомных пациентов с наследственным ТТР амилоидозом. Второй столбец (обозначенный «нас-АТТР-тафамидис») иллюстрирует результаты для пациентов с наследственным амилоидозом ТТР, получавших тафамидис. Третий столбец (обозначенный «нас-АТТР-без лечения») иллюстрирует результаты для нелеченных пациентов с наследственным амилоидозом ТТР. Четвертый столбец (обозначенный «нас-АТТР-печеночный транспл.») иллюстрирует результаты для пациентов с наследственным амилоидозом ТТР с печеночным трансплантатом. Пятый столбец (обозначенный «дт-АТТР») иллюстрирует результаты для пациентов с

амилоидозом АТТР дикого типа. Шестой столбец (обозначенный «Норма») иллюстрирует результаты для здоровых добровольцев. Точки - это отдельные данные, а планки погрешности - среднее и СО. * 0,01-0,05, ** 0,0005-0,0099, ***0,0001-0,005, и ****<0,0001 по сравнению с контролем нормой (непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с коррекцией множественности сравнений по Данну).

[0378] Сокращения, используемые в Фиг. 1:

асимптом. = асимптоматический; АТТР = амилоид транстиретина; экв = эквиваленты; ГуГХЛ = гуанидин гидрохлорид; нас = наследственный; н-свер = неправильно свернутый; std. = стандарт; транспл. = трансплантат; дт = дикий тип

[0379] Среди пациентов с наследственным амилоидозом ТТР, средние уровни неправильно свернутого ТТР были значительно выше чем у нелеченных пациентов, включая наблюдение того, что бессимптомные носители демонстрировали наличие неправильно свернутого ТТР до появления симптомов заболевания, и пациенты, получавшие тафамидис все еще демонстрировали наличие циркулирующего неправильно свернутого ТТР, однако у пациентов с трансплантацией печени уровни были похожи на таковые нормальных контролей с небольшим количеством или не обнаруживаемым количеством неправильно свернутого ТТР. Средние концентрации неправильно свернутого ТТР в образцах пациентов с наследственным амилоидозом ТТР с повышенными уровнями варьировали от 32 до 59 нг-экв/мл по сравнению с 4 нг-экв/мл в нормальных контролях. Пациенты с наследственным амилоидозом ТТР с печеночным трансплантатом продуцируют нормально свернутый ТТР, что в результате дает уровни неправильно свернутого ТТР, которые были аналогичны таковым нормальных, здоровых субъектов. Образцы пациентов с амилоидозом АТТР дикого типа, за исключением одного выброса, также имели малое количество или вообще не обнаруживаемое количество неправильно свернутого ТТР, подобное таковому плазме нормы, что позволяет предположить, что неправильное сворачивание ТТР может происходить локально в пораженной ткани, и неправильно свернутый ТТР не всегда быстро циркулирует в этой подгруппе пациентов с амилоидозом АТТР дикого типа.

[0380] Среди отмеченных выбросов в образцах пациентов, леченных тафамидисом (1 низкий уровень неправильно свернутого ТТР), и с амилоидозом АТТР дикого типа (1 высокий уровень неправильно свернутого ТТР), неясно, представляют ли расходящиеся значения нормальное отклонение пациента или были вызваны процедурной ошибкой (т. е. непреднамеренная неправильная маркировка образцов). В результате все сообщенные значения были включены в оценки данных.

[0381] Кроме того, анализ способен обнаружить неправильно свернутый ТТР в

плазме из пациентов с наследственным амилоидозом TTR, несущих мутации в позиции 89 в пределах эпитопа 9D5 TTR. Две мутации (E89K и E89Q), которые попадают в пределы эпитопа 9D5 (аминокислотные остатки 89-97), не влияют на связывание 9D5 в анализе. Хотя аланиновое картирование эпитопа показало, что этот остаток менее важен для связывания антитела, было неизвестно, влияют ли на связывание антитела замены, которые не являются консервативными, например, с кислой или основную аминокислоту (E89K), или с заряженную на незаряженную (E89Q). Стрелки на Фиг. 1 указывают на эти замены и пригодность анализа для мутаций по этой аминокислоте. В Таблице 5 показаны все исследованные образцы и результаты поликлонального анализа 9D5-Dako.

Таблица 5
исследованные образцы и результаты анализа 9D5-Dako

ID Pro	ID Коллаборатора	Возраст	Пол	TTR Мутация	Лечение	неправильно свернутый TTR (нг-экв/мл)
1	8120326	37	М	V30M	Печеночный транспл.	4
2	16091078	67	Ж	V30M	Без лечения	24
4	3098983	44	М	V30M	Печеночный транспл.	4
5	98084122	44	Ж	Y114C	Тафамидис	26
6	1051830	45	Ж	V30M	Печеночный транспл.	3
7	12004496	44	М	V30M	Печеночный транспл.	3
8	16032804	74	М	V30M	Без лечения	27
10	13097486	39	М	V30M	Тафамидис	26
11	11017266	30	Ж	V30M	Печеночный транспл.	3
12	14094510	72	М	V30M	Тафамидис	27
13	14053483	66	М	V30M	Тафамидис	29
14	96038112	53	Ж	V30M	Печеночный транспл.	2
15	11019596	48	М	V30M	Тафамидис	33

16	8099635	44	Ж	V30M	Печеночный транспл.	4
17	8110529	41	Ж	V30M	Тафамидис	45
18	16015447	52	М	G47R	Печеночный транспл.	4
19	95023663	54	Ж	V30M	Печеночный транспл.	3
20	4080271	38	М	Y114C	Тафамидис	29
21	16012192	34	М	S50I	Асимптом.	19
22	84041739	54	Ж	V30M	Печеночный транспл.	3
23	98063581	38	Ж	S50I	Асимптом.	24
24	16123223	24	М	V30M	Без лечения	35
25	15085485	35	Ж	V30M	Тафамидис	30
26	5069417	37	Ж	V30M	Печеночный транспл.	6
27	8095365	48	Ж	V30M	Печеночный транспл.	4
28	8099602	70	Ж	V30M	Тафамидис	37
29	16050297	27	Ж	G47R	Асимптом.	48
30	16013388	68	Ж	V30M	Тафамидис	63
31	94045408	63	Ж	V30M	Печеночный транспл.	5
32	9105775	48	М	V30M	Печеночный транспл.	8
33	8127510	42	Ж	V30M	Асимптом.	66
34	16129566	62	М	E61L	Тафамидис	4
35	9007376	34	Ж	V30M	Асимптом.	88
36	98029314	41	Ж	V30M	Асимптом.	77
37	15030924	26	М	V30M	Асимптом.	80
38	15030913	27	Ж	V30M	Асимптом.	90
39	17032391	39	М	T49S	Асимптом.	15
40	12120567	64	М	V30M	Тафамидис	56
42	13063964	41	Ж	Y114C		
44	17057097	62	М	V30M		

45	17090197	72	М	V30M		
46	14044203	27	Ж	Y114C	Асимптом.	
47	15048606	38	М	F33V		
SSA-1	15090038	81	М	дт-АТТР	Без лечения	6
SSA-2	85017908	84	Ж	дт-АТТР	Без лечения	6
SSA-3	16023646	78	М	дт-АТТР	Без лечения	6
N1	н/п	38	М	Норма	н/п	7
N2	н/п	22	Ж	Норма	н/п	3
N3	н/п	24	Ж	Норма	н/п	4
N4	н/п	42	М	Норма	н/п	4
N5	н/п	29	Ж	Норма	н/п	3
N6	н/п	34	Ж	Норма	н/п	3
N7	н/п	51	М	Норма	н/п	3
N8	н/п	30	М	Норма	н/п	4
N9	н/п	28	М	Норма	н/п	6
1	03РА17002004001	н/п	М	A45T	Асимптом.	50
2	557722	н/п	М	E89K	Асимптом.	96
3	913320	н/п	Ж	E89Q	Без лечения	32
4	03РА17000804	н/п	Ж	V122I	Без лечения	18
5	03РА17002702	н/п	М	V30M	Без лечения	76
6	03РА17001104	н/п	М	дт-АТТР	Без лечения	96
7	03РА17001904	н/п	М	дт-АТТР	Без лечения	7
8	03РА17000704	н/п	М	дт-АТТР	Без лечения	7

Асимптом. = асимптоматический; АТТР = амилоид транстиретина; экв = эквиваленты; н-свер = неправильно свернутый; н/п = не применимо; дт = дикий тип

Пример 4. *Ex Vivo* анализ связывания с целью в отобранных образцах из пациентов с амилоидозом ТТР с повышенными уровнями неправильно свернутого ТТР

[0382] Для измерения способности потенциального терапевтического антитела к н-свер-ТТР (m14G8, 14G8 мыши) связываться с н-свер-ТТР в плазме (связывание с целью), плазму АТТР (V30M) с высокими уровнями н-свер-ТТР обрабатывали *ex vivo* увеличивающимся количеством m14G8. Связывание m14G8 с н-свер-ТТР плазмы (целью) должно уменьшить количество оставшегося несвязанного (свободного) н-свер-ТТР, так как сайты связывания становятся занятыми m14G8, что приводит к зависимому от концентрации снижению сигнала MSD и свидетельству связывания с целью этого

н-свер-ТТР мАт. Фиг. 9 иллюстрирует диаграмму такого анализа связывания с целью.

[0383] Образцы плазмы из 12 пациентов с повышенными уровнями неправильно свернутого ТТР, как измерено в анализе свободного неправильно свернутого ТТР, были отобраны для анализа в эксперименте связывания с целью, чтобы показать, что м14G8 (14G8 мыши) снижает уровни свободного неправильно свернутого ТТР при внесении в плазму пациента. Поскольку 9D5 (плащечный лиганд MSD) и м14G8 связываются с одним и тем же эпитопом и конкурируют за свободный неправильно свернутый ТТР, анализ эффективно количественно определяет свободный неправильно свернутый ТТР, не связанный с м14G8 (т. е. связанный с 9D5), что приводит к снижению обнаружения сигнала ЭХЛ при проигрыше конкуренции м14G8, связанном с неправильно свернутым ТТР. В чистую плазму пациента с амилоидозом ТТР вносили диапазон концентраций м14G8 (0, 12, 40, 120, 400 или 1200 пг/мл) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Образцы разбавляли 1:5, и анализ и построение стандартных кривых выполняли, как описано в Примере 2.

[0384] На Фиг. 2 показана кривая конкуренции антител для иллюстративных образцов плазмы пациентов с амилоидозом ТТР с повышенными уровнями неправильно свернутого ТТР, обозначающая уровни свободного неправильно свернутого ТТР (%) в присутствии возрастающих концентраций м14G8.

[0385] Сокращения, используемые в Фиг. 2:

EC50 = эффективная концентрация 50% (свободный/не связанный с м14G8); н-свер = неправильно свернутый

[0386] Среднее значение (точка) и СО (планка погрешности) 12 индивидуальных образцов плазмы нас-АТТР (каждое значение образца с внесением нормализовано к его сигналу ЭХЛ до внесения при 0 нМ м14G8 в плазме, т. е. 100% несвязанного неправильно свернутого ТТР). Линия соответствует асимметричной сигмоидальной нелинейной кривой подгонки данных.

[0387] Высокий фон компенсировался вычитанием фонового сигнала при максимальной конкуренции. Поскольку биоанализ обнаруживает только неправильно свернутый ТТР, не связанный с м14G8 (свободный неправильно свернутый ТТР), связывание неправильно свернутого ТТР м14G8 приводит к снижению сигнала ЭХЛ с увеличением м14G8 в плазме. Соответственно, наблюдалось зависимое от концентрации м14G8 снижение уровней свободного неправильно свернутого ТТР (%), подтверждая, что м14G8 был способен поражать (связываться с) неправильно свернутый ТТР (включая мономер) в плазме пациентов нас-ТТР при оцененной EC50 343 нМ (~ 50 пг/мл). Этот анализ используется для информирования о связывании с целью в испытаниях 14G8.

Пример 5: Способ ЭХЛ для определения свободного неправильно свернутого ТТР в плазме (9D5/18C5)

[0388] Способ: Свободный (несвязанный) неправильно свернутый ТТР, включая мономер, обнаруживали в плазме человека с использованием способа исследования - количественного анализа ЭХЛ (Meso Scale Discovery; MSD). 96-луночную MSD-плашку покрывали 30 мкл/лунка 4 мкг/мл нейтравидина в ФСБ, инкубировали в течение ночи при 4 °С, и трижды промывали в TBS, содержащем 0,05% Tween 20. Плашки имели сайты неспецифического связывания, блокированные 3% «Блокатором А» MSD в ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием, с последующей трехкратной промывкой. 30 мкл 1 мкг/мл 9D5-биотин в буфере для анализа (1% MSD «Блокатор А»/ФСБ + 0,05% Tween-20) добавляли в каждую лунку и инкубировали 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. Стандартную кривую получали из свежей аликвоты ТТР в 6М гуанидин HCl, разведенной в буфере для анализа (Assay Buffer). Стандартная кривая состояла из семи 5-кратных разведений, начиная с 1000 нг/мл и заканчивая 64 пг/мл. Плазму пациента или контроля разбавляли 1:5 в буфере для анализа. Стандартную или разбавленную плазму (30 мкл) добавляли в плашки в двух повторностях, инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа, с последующим промыванием. 30 мкл меченого SULFO-TAG 18C5 в концентрации 1 пг/мл в буфере для анализа добавляли в каждую лунку, инкубировали 1 час со встряхиванием, с последующим промыванием. 150 мкл/лунка 1X «Буфера считывания Т» MSD добавляли в каждую лунку и считывали в течение 10 минут на MSD Sector Imager S600. Верхний и нижний стандарты были опорными точками, и кривая имела количественный диапазон в чистой плазме от 1,6 до 1000 нг/мл эквивалентов на основе стандарта гуанидин-HCl ТТР.

[0389] Результаты показаны на Фиг. 3. Первый столбец (обозначенный «нас-АТТР асимптом.») иллюстрирует результаты для бессимптомных пациентов с наследственным ТТР амилоидозом. Второй столбец (обозначенный «нас-АТТР-тафамидис») иллюстрирует результаты для пациентов с наследственным амилоидозом ТТР, леченных тафамидисом. Третий столбец (обозначенный «нас-АТТР-без лечения») иллюстрирует результаты для нелеченных пациентов с наследственным амилоидозом ТТР. Четвертый столбец (обозначенный «нас-АТТР-печеночный транспл.») иллюстрирует результаты для пациентов с наследственным амилоидозом ТТР с печеночным трансплантатом. Пятый столбец (обозначенный «Норма») иллюстрирует результаты для здоровых добровольцев.

[0390] Точки - это отдельные данные, а планки погрешности - среднее и СО. * 0,01-0,05, ** 0,0005-0,0099, ***0,0001-0,005, ****<0,0001 по сравнению с контролем нормой (непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с коррекцией множественности

сравнений по Данну).

[0391] Сокращения, используемые в Фиг. 3:

асимптом. = асимптоматический; АТПР = амилоид транстиретина; экв = эквиваленты; ГуГХЛ = гуанидин гидрохлорид; нас = наследственный; н-свер = неправильно свернутый; std. = стандарт; транспл. = трансплантат; дт = дикий тип

Пример 6. Приготовление иммуногена, и иммунизации мышей к 18С5

[0392] Самкам мышей BALB/c и C57BL/6 инъецировали транстиретин, сконструированный с мутацией по F87M и L110M, называемый двойным мутантом по транстиретину (ТПР-ДМ). Выполняли внутрибрюшинную инъекцию 50 мкг/мышь для трех инъекций, с последующей 25 мкг/мышь для 3 инъекций, и с последующей 10 мкг/мышь для 4 инъекций, ТПР-ДМ, эмульгированного в адьюванте RIBI, еженедельно с использованием 5 BALB/c, дополнительно 5 C57BL/6 мышам давали 3 инъекции по 50 мкг/мышь, 3 инъекции по 25 мкг/мышь, и 4 инъекции по 10 мкг/мышь, эмульгированные в адьюванте RIBI. Мышей титровали против ТПР-ДМ, нативного тетрамерного ТПР и his-МСАМ. Мыши с наивысшими титрами ТПР-ДМ и наименьшими титрами нативного тетрамерного ТПР и his-МСАМ (BALB/c № 1 и 5, и C57BL/6 № 4 и 5) были гибридизованы с помощью модификации Келера и Мильштейна. Полученные в результате гибридомы подвергали скринингу против ТПР-ДМ, нативного тетрамерного ТПР и his-МСАМ. Гибридомы, проявляющие специфичность к ТПР-ДМ, были клонированы и дополнительно охарактеризованы. Было идентифицировано 18С5.

Пример 7. Характеристика 18С5 с помощью VIAcore

[0393] Анализ проводили с использованием ViaCore T200 для сравнения аффинности связывания антител мыши с рекомбинантным ТПР человека, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-чТПР), ТПР яванского макака, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-яТПР), и нативным тетрамерным ТПР человека. Анти-мышинное антитело иммобилизовали на сенсорном чипе CM3 (GE Healthcare Life Sciences) посредством аминного связывания, и антитела мыши (лиганд) захватывали до уровня, обеспечивающего максимальное связывание аналита с 50 ОЕ (относительных единиц) (примерно 250 ОЕ связывания лиганда). Различные концентрации Гу-ТПР (в диапазоне от 0,4 нМ до 100 нМ) пропускали через захваченный лиганд со скоростью 50 мкл/мин в рабочем буфере (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА, 50 mM Гу-НСI) с временем ассоциации 300 с и временем диссоциации 900 с. Регенерацию поверхности чипа осуществляли двумя короткими инъекциями 10 mM глицина-НСI при pH 1,7. Концентрации применяемого Гу-яТПР изменялись от 1 нМ до 1000 нМ, в то время как концентрации тетрамера ТПР человека изменялась от 10 нМ до 10000 нМ. Из данных вычитали значения

контроля для датчика, не содержащего лиганд, и для концентрации 0 нМ аналита. Анализ выполняли с использованием общей аппроксимации 1:1, подогнанной с помощью программного обеспечения Biacore Evaluation (v3.0), с индексом совокупного показателя преломления равным нулю ОЕ. Данные по связыванию показаны в Таблице 6.

Таблица 6

Данные по связыванию 18С5 с неправильно свернутым ТТР человека и неправильно свернутым ТТР яванского макака, и тетрамером ТТР человека.

ТТР	кс 1/Мс	кот 1/с	Кд нМ
Неправильно свернутый ТТР человека	$1,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^{-4}$	5,9 нМ
Неправильно свернутый ТТР яванского макака	$1,0 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-4}$	Минимальное связывание при высокой концентрации, трудно оценить Кд
Тетрамер ТТР человека	$2,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^{-4}$	Минимальное связывание при высокой концентрации, трудно оценить Кд

Пример 8. Характеристика химерного 18С5 с помощью ВІАсоре

[0394] Анализ проводили с использованием Biacore T200 для сравнения аффинности связывания мышинового и химерного антител с рекомбинантным ТТР человека, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-чТТР). Анти-человеческое антитело иммобилизовали в каналах 1 и 2, анти-мышинное антитело иммобилизовали в каналах 3 и 4 на сенсорном чипе CM3 (GE Healthcare Life Sciences) посредством аминного связывания, химерные и мышинные антитела 18С5 (лиганд) захватывали до уровня, обеспечивающего максимальное связывание аналита с 50 ОЕ (относительных единиц) (примерно 250 ОЕ связывания лиганда). Различные концентрации Гу-ТТР (в диапазоне от 0,4 нМ до 100 нМ) пропускали через захваченный лиганд со скоростью 50 мкл/мин в рабочем буфере (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА, 50 мМ Гу-НСl) с временем ассоциации 300 с и временем диссоциации 900 с. Регенерацию поверхности чипа осуществляли 2-мя короткими инъекциями 3М хлорида магния и 2-мя короткими инъекциями 10 мМ глицина-НСl при рН

1,7. Из данных вычитали значения контроля для датчика, не содержащего лиганд, и для концентрации 0 нМ аналита. Анализ выполняли с использованием общей аппроксимации 1:1, подогнанной с помощью программного обеспечения Biacore Evaluation (v3.0), с индексом совокупного показателя преломления равным нулю OE. Данные по связыванию показаны в Таблице 7.

[0395] Аминокислотная последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи химерного антитела 18C5 представлена как SEQ ID NO: 81, аминокислотная последовательность зрелой варибельной области легкой цепи химерного антитела 18C5 представлена как SEQ ID NO: 87, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человека SEQ ID NO: 17, и аминокислотная последовательность константной области легкой цепи человека SEQ ID NO: 19.

[0396] Таблица 7. Данные по связыванию мышиноного и химерного антител с рекомбинантным ТТР человека, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-чТТР).

ТТР	кс 1/Мс	кот 1/с	Кд нМ
Химерное 18C5	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-4}$	1,8 нМ
Мышиное 18C5	$9,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^{-4}$	2,2 нМ

Пример 9. Эпитопное картирование 18C5

[0397] Первоначальное картирование показало, что эпитоп для 18C5 находится в пределах 87-127 SEQ ID NO: 26. Дополнительное картирование показало, что эпитоп лежал между 101-109 SEQ ID NO: 26. Гораздо более низкая аффинность к неправильно свернутому ТТР яванского макака позволяет предположить, что аминокислота 104 является важной, поскольку это единственная аминокислотная замена между ТТР человека и яванского макака.

Пример 10. Последовательность 18C5

[0398] Гибридомный клон 18C5 - LA89 18C5. Осадок замороженных клеток A1.A1 использовали для выделения и очистки мРНК. Выделение и очистку мРНК проводили с использованием протокола мини-набора «Oligotex direct mRNA» (Qiagen, кат. № 72022). Вкратце, 9×10^6 клеток гибридного клона лизировали и гомогенизировали в присутствии высокоденатурирующего гуанидин-изотиоцианатного буфера, который инактивирует РНКазы. Суспензию Oligotex добавляли к лизирующей смеси, позволяя происходить гибридизации между олиго dT30 частицами Oligotex и поли-А-хвостом мРНК. Загрязняющие вещества смывали и элюировали поли-А+ РНК. мРНК подвергали обратной

транскрипции кДНК с использованием набора для амплификации кДНК Marathon «Marathon cDNA amplification kit» (Clontech, кат. № 634913). Адаптер лигировали с 5'-концом кДНК. Способ 5' RACE использовался для амплификации областей V. Для проведения ПЦР использовали консенсусные праймеры области 5' V и специфичные для константной области опорные праймеры. Амплифицированные области V клонировали в вектор клонирования pTOPO и трансформировали в *E. coli* Top10. Выращивали 15-20 отдельных колоний и секвенировали очищенную плазмиду. Последовательность клона считалась подлинной последовательностью области V, если она удовлетворяла следующим критериям

Нет стоп-кодона между Met и областью C

Последовательность содержит ключевые признаки областей V антител

Последовательность содержит определяемые CDR.

Минимум три отдельных клон с соответствующими OPC (открытой рамкой считывания)

[0399] Установленные последовательности вариабельной области клонировали в векторы экспрессии и трансфицировали в клетки CHO. Очищенное химерное антитело характеризовали на связывание с использованием 18C5 мыши в качестве контрольного антитела.

[0400] Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи 18C5 представлена как SEQ ID NO: 81, и аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи 18C5 представлена как SEQ ID NO: 87. Аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи по совмещенной Кабата/Чотиа представлены как SEQ ID NO: 5, 7 и 9, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи по совмещенной Кабата/Чотиа представлены как SEQ ID NO: 11, 13 и 15, соответственно.

Пример 11. Специфичность 18C5, продемонстрированная с помощью анализа вестерн-блоттингом

[0401] Чтобы продемонстрировать конформационную специфичность 18C5 по отношению к ненативному (денатурированному) ТТР, анализ вестерн-блоттингом выполняли следующим образом:

Методика:

[0402] ДСН-полиакриламидные гели

[0403] Нативный ТТР: 1,0, 0,5 и 0,1 мкг образца рекомбинантного ТТР человека в буфере для образцов LDS (Life Technologies) прогнали в 10% бис-трис-геле NuPAGE

(буфер MES; 90 В, 105 мин) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны для анализа вестерн-блоттингом.

[0404] Денатурированный ТТР: Рекомбинантный ТТР человека готовили, как описано выше для нативного ТТР, за исключением того, что буфер образца LDS содержал восстанавливающий агент, и образцы денатурировали кипячением перед электрофорезом ДНС-ПААГ.

[0405] Анализ вестерн-блоттингом

[0406] Гели ДНС-ПААГЭ блоттировали на нитроцеллюлозные мембраны (iBlot, Life Technologies), обрабатывали блокирующим буфером (LI-COR, Линкольн, Небраска) и инкубировали в 1,0-мкг/мл первичного антитела, промывали 1x TBS и помещали в 1:20000 разведение IRDye-800CW-конъюгированного козьего анти-мышья или анти-кролик вторичного антитела (LI-COR, Линкольн, Небраска), затем визуализировали на инфракрасном визуализаторе Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, Небраска).

[0407] Результаты и выводы:

[0408] Вестерн-блоттинг нативного в сравнение с денатурированным рекомбинантным ТТР (Фиг. 4) показал, что 18C5 обладал очень слабой реакционной способностью в отношении нативных частиц ТТР (дорожки 1-3), но очень сильной реакционной способностью в отношении денатурированного мономера ТТР (~ 15 кДа), с незначительной реакционной способностью в отношении денатурированного димера (~ 30 кДа) (дорожки 5-7). Дорожка 4 показывает маркеры молекулярной массы.

[0409] Напротив, коммерческое антитело ТТР (Sigma, кат. № НРА002550), которое не является конформационно специфичным, не различало нативный и денатурированный ТТР, и показало очень сильную реактивность по отношению к мономерному, а также димерному нативному и денатурированному ТТР (Фиг. 5). Дорожки 1-3 показывают результаты для нативного ТТР; Дорожка 4 показывает маркеры молекулярной массы, а дорожки 5-7 показывают результаты для денатурированного ТТР.

Пример 12. Использование 18C5 в потенциальной диагностике амилоидоза ТТР

[0410] Сэндвич-иммуноанализ с использованием электрохемилюминесцентной платформы Meso Scale Discovery (MSD) был использован для выявления совокупного неправильно свернутого ТТР (совокупный н-свер-ТТР) в образцах плазмы пациентов. Образцы были взяты у обычных пациентов и пациентов с транстиретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР). Пациенты с транстиретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР) имели следующие мутации ТТР и виды лечения: АТТР (наследственная амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) с печеночным трансплантатом, АТТР (наследственная амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) без лечения, АТТР (наследственная

амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) с тафамидисом, АТТР (Y114C наследственная амилоидная полиневропатия (НАП)) с тафамидисом, и АТТР (S50I) без лечения.

[0411] Вкратце, 96-луночную стандартную плашку MSD сначала покрывали белком NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с последующим блокированием 3% «Блокатором А» в ФСБ (MSD, Роквилл, Мэриленд). Затем в каждую лунку добавляли биотинилированный 18C5 в концентрации 0,5 мкг/мл для захвата неправильно свернутого ТТР. Образцы плазмы разбавляли в 5 раз в 1% «Блокаторе А»/ФСБ перед переносом на плашку MSD вместе с денатурированным гуанидином ТТР в качестве стандартного образца. После 1-часовой инкубации, неправильно свернутый ТТР, связанный с лунками, детектировали с помощью SULFO-TAG™-меченного поликлонального кроличьего анти-человеческий ТТР (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). Хемилюминесцентные сигналы, пропорциональные количеству неправильно свернутого ТТР, генерировались добавлением 1X «Буфера считывания» MSD и регистрировались на планшет-ридере MESO SECTOR S 600.

[0412] Результаты показаны на Фиг. 6. Первый столбец (обозначенный «нас-АТТР асимптом.») иллюстрирует результаты для пациентов с транстиретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), с лечением или без лечения тафамидисом. Второй столбец (обозначенный «нас-АТТР-печеночный транспл.») иллюстрирует результаты для пациентов с транстиретин-опосредованным амилоидозом (АТТР) с печеночным трансплантатом. Третий столбец (обозначенный «Норма») иллюстрирует результаты для обычных пациентов. 18C5 обнаружил повышенный неправильно свернутый ТТР у всех пациентов, кроме одного, с транстиретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), которые не подвергались трансплантации печени. У пациентов с транстиретин-опосредованным амилоидозом (АТТР), перенесших трансплантацию печени, и у обычных пациентов отмечен низкий уровень неправильно свернутого ТТР, с одним исключением в группе с трансплантацией печени. Следует отметить, что уровни представляют собой эквиваленты в нг/мл, исходя из стандартной кривой денатурированного гуанидином ТТР. У двоих пациентов с аномальными результатами образцы были отобраны в один и тот же день, и, возможно, образцы были перепутаны при разделении на аликвоты.

Пример 13. 18C5-18C5 для определения мультимерного неправильно свернутого ТТР

[0413] Сэндвич-иммуноанализ с использованием электрохемилюминесцентной платформы Meso Scale Discovery (MSD) был использован для выявления совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР (совокупный мультимерный н-свер-ТТР) в образцах плазмы пациентов. Образцы были взяты у обычных пациентов и пациентов с

транстретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР). Пациенты с транстретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР) имели следующие мутации ТТР и виды лечения: АТТР (наследственная амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) с печеночным трансплантатом, АТТР (наследственная амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) без лечения, АТТР (наследственная амилоидная полиневропатия V30M (НАП)) с тафамидисом, АТТР (Y114C наследственная амилоидная полиневропатия (НАП)) с тафамидисом, и АТТР (S50I) без лечения.

[0414] MSD плашки покрывали в течение ночи 4 мкг/мл NeutrAvidin. Плашки блокировали в течение 1 часа 3% «Блокатором А» MSD, затем 3 раза промывали трис-буферным солевым раствором с 0,1% Tween-20 (TBS-T). 1 мкг/мл биотинилированного 18C5 добавляли в течение 1 часа с последующей 3-кратной промывкой TBS-T. Образцы разводили в 5 раз разбавителем образцов (ФСБ + 0,1% БСА + 0,05% Triton X-100) и затем добавляли в плашки в двух повторностях. Использовали стандартную кривую ТТР-ДМ в диапазоне концентраций от 64 пг/мл до 1 мкг/мл, с контрольной пробой 0 мкг/мл. Плашки промывали 3 раза TBS-T с последующим добавлением 1 мкг/мл 18C5, меченного Sulfo-tag MSD, в разбавителе образцов, и инкубировали в течение 1 часа. В заключение, плашки трижды промывали TBS-T и добавляли 150 мкл «Буфера чтения Т» (Read Buffer T) MSD, и плашки считывали на считывателе плашек MESO SECTOR S 600. Образцы анализировали с использованием Discovery Workbench 4.0 MSD.

[0415] Результаты показаны на Фиг. 7. Первый столбец (обозначенный «нас-АТТР асимптом.») иллюстрирует результаты для пациентов с транстретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР), с лечением или без лечения тафамидисом. Второй столбец (обозначенный «нас-АТТР-печеночный транспл.») иллюстрирует результаты для пациентов с транстретрин-опосредованным амилоидозом (АТТР) с печеночным трансплантатом. Третий столбец (обозначенный «Норма») иллюстрирует результаты для обычных пациентов. Хотя не так много образцов были положительными на мультимерный ТТР, все положительные были в образцах пациентов ТТР, при этом была статистическая разница, используя критерий Крускала-Уоллиса с коррекцией по Данну, - $P=0,04$ с образцами пациентов и пациентами с печеночным трансплантатом, и $P=0,004$ между пациентами и контролем-нормой. Не было статистической значимости между контролем-нормой и пациентами, прошедшими трансплантацию печени.

Пример 14. 9D5 обнаруживает повышенные уровни н-свер-ТТР (неправильно свернутых мономеров и олигомеров ТТР) в плазме из пациентов с наследственным АТТР

[0416] Сбор плазмы АТТР и нормы

Кровь из пациентов с АТТР с положительным диагнозом наследственного (нас-АТТР) и АТТР дикого типа (дт-АТТР) собирали в 7 мл пробирки Vacutainer К2-ЭДТК, и центрифугировали для удаления клеточного дебриса. Фракции плазмы аликвотировали в 1,5 мл пробирки LoBind Eppendorf и немедленно замораживали. Образцы плазмы из здоровых нормальных добровольцев собирали таким же образом. Все образцы использовались сразу после оттаивания и не замораживались повторно. Образцы соответствуют описанию в Таблице 5.

[0417] Анализ плазмы АТТР с помощью вестерн-блоттинга

Образцы плазмы разбавляли в 10 раз в буфере для образцов с додецилсульфатом лития (Life Technologies), наносили (12 мкл) на 10% бис-трис-гель NuPAGE, подвергали электрофорезу при 90 В в течение 105 мин, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и зондировали 1,0 мкг/мл с помощью н-свер-ТТР 9D5 с последующим 1:20000 разведения вторичного антитела коза-анти-мышь, конъюгированного с IRDye 800CW (LICOR). Затем блот промывали и визуализировали на инфракрасном визуализаторе Odyssey CLx (LI-COR). Результаты показаны на Фиг. 8.

[0418] Описание Фиг. 8:

Первичное мАт: 1 мкг/мл 9D5; М - маркеры молекулярной массы (BioRad); полностью черная звезда - пациенты ТТР-V30М без трансплантации печени; заштрихованная звезда (пациенты 5, 20) - ТТР-T114С; незакрашенная звезда (пациенты 21, 23) ТТР-S50I; нет звезды - трансплантация печени; 1N-5N - норма (соответствуют идентификаторам Pro ID N1-N5 в Таблице 5).

[0419] Конформационно-специфическое антитело 9D5 к н-свер-ТТР обнаруживает повышенные уровни видов н-свер-ТТР (мономеров и олигомеров) в плазме, полученной из пациентов с наследственным АТТР. Напротив, в плазме из пациентов с наследственным АТТР, которые прошли лечение трансплантацией печени, были едва определяемые уровни н-свер-ТТР, подобные тем, которые были в плазме из обычных людей.

Пример 15. Повышенные уровни н-свер-ТТР в плазме из пациентов с наследственным АТТР

[0420] Сбор плазмы АТТР и нормы

[0421] Кровь из пациентов с АТТР с положительным диагнозом наследственного АТТР (нас-АТТР) и АТТР дикого типа (дт-АТТР) собирали в 7 мл пробирки Vacutainer К2-ЭДТК, и центрифугировали для удаления клеточного дебриса. Фракции плазмы аликвотировали в 1,5 мл пробирки LoBind Eppendorf и немедленно замораживали. Образцы плазмы из здоровых нормальных добровольцев собирали таким же образом. Все образцы использовались сразу после оттаивания и не замораживались повторно. Образцы

соответствуют описанию в Таблице 5.

[0422] Совокупный н-свер-ТТР в плазме человека был обнаружен с помощью качественного электрохемилюминесцентного анализа Meso Scale Discovery (MSD). Плашки MSD покрывали в течение ночи 4 мкг/мл NeutrAvidin, а затем 1 мкг/мл биотинилированного н-свер-ТТР 9D5. Образцы плазмы разводили в 5 раз разбавителем образцов (ФСБ + 0,1% БСА + 0,05% Tween-20) перед добавлением в плашку. Плашки промывали TBS-T с последующим добавлением 1 мкг/мл анти-ТТР поликлонального антитела (Dako), меченного Sulfo-tag MSD. Плашки промывали TBS-T и считывали на MSD Sector S 600 после добавления 150 мкл/лунка разбавленного «Буфера чтения Т» MSD. Образцы анализировали с использованием MSD Discovery Workbench 4.0.

[0423] Результаты показаны на Фиг. 10.

[0424] Описание Фиг. 10: нас-АТТР - наследственный АТТР; Печеноч. трансплант. - печеночный трансплантат. Пределы количественного определения (НПО - ниже предела определения) 1,0 нг/мл; планки погрешности представляют средние по группам и СО; р-значения, критерий Манна-Уитни.

[0425] Уровни н-свер-ТТР в плазме из пациентов с наследственным АТТР значительно повышены по сравнению с контролями-нормой. Повышенные уровни н-свер-ТТР также наблюдались у бессимптомных индивидов, положительно генотипированных в отношении мутаций ТТР. Нормальные, низкие (<10 нг/мл до НПО) уровни н-свер-ТТР наблюдали в плазме из пациентов с наследственным АТТР, которые прошли лечение в виде трансплантации печени.

Пример 7. Конструирование гуманизированных антител 18C5.

[0426] Исходной точкой или антителом-донором для гуманизации было антитело 18C5 мыши. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи зрелого m18C5 представлена как SEQ ID NO: 81. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи зрелого m18C5 представлена как SEQ ID NO: 87. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи по совмещенной Кабата/Чотиа представлены как SEQ ID NO: 5, 7 и 9, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи по Кабату представлены как SEQ ID NO: 11, 13 и 15, соответственно. Нумерация по Кабату используется повсеместно.

[0427] Выравнивание последовательностей варибельных областей 18C5 с консенсусными последовательностями варибельных областей антител по Кабату, *et al.* указывает на то, что варибельная область тяжелой цепи (VH) 18C5 принадлежит подгруппе 3b VH мыши, которая соответствует подгруппе 3 VH человека. Варибельная область легкой цепи каппа (VL) 18C5 принадлежит подгруппе 2 Vk мыши, которая

соответствует подгруппе 2 Vk человека. [Kabat E.A., et al, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242.].

[0428] Остатки, которые встречаются в интерфейсе между доменами V_k и V_h, являются обычными, за исключением того, что Ala находится в позиции 37 в тяжелой цепи, тогда как обычно в этой позиции находятся Val или Ile. Leu в позиции 95 в V_h обычно представляет собой Asp, Gly или Ser. Эти позиции являются кандидатами на внесение обратных мутаций. Для цепи V_k Glu 34 обычно представляет собой Ala, His, Asn или Ser, и эти позиции являются кандидатами на внесение обратных мутаций.

[0429] CDR V_H и V_L 18C5 были идентифицированы с использованием правил идентификации CDR на основе последовательностей по Мартину. Затем CDR были отнесены к каноническим классам по Чотиа с использованием сводных данных по ключевым остаткам, представленным в Таблице 3.5 Мартина (Martin ACR. (2010). In: Kontermann R and Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer International Publishing AG.):

CDR-H1 состоит из 10 аминокислот и похож на канонический класс 1 по Чотиа.

CDR-H2 состоит из 17 аминокислот и похож на канонический класс 3 по Чотиа.

CDR-H3 состоит из 4 аминокислот; нет классов для CDR-H3.

CDR-L1 состоит из 16 аминокислот и похож на канонический класс 4 по Чотиа.

CDR-L2 состоит из 7 аминокислот и похож на канонический класс 1 по Чотиа.

CDR-L3 состоит из 9 аминокислот и похож на канонический класс 1 по Чотиа.

[0430] Был проведен поиск по белковым последовательностям в базе данных PDB [Deshpande et al, 2005, Nucleic Acids Research 33:D233-D237], чтобы найти структуры, которые бы предоставили примерную структурную модель 18C5. Кристаллическая структура Fab c#17 антитела анти-пироглутамат-Abeta мыши (код PDB - 5MYK) [Piechotta, A. et al. f(2017) J. Biol. Chem. 292: 12713-12724) использовали как для структуры V_h, так и для структуры V_k, поскольку она имела хорошее разрешение (1,6Å) и общее сходство последовательностей с V_h и V_k 18C5, сохраняя одинаковые канонические структуры для петель. Программное обеспечение Bioluminate было использовано для моделирования примерной структуры 18C5. Это программное обеспечение лицензировано Schrodinger Inc.

[0431] Каркасы V_H и V_L 18C5 имеют высокую степень сходства последовательностей с соответствующими областями гуманизированного Fab Crenezumab (CreneFab) PDB: 5VZY, сконструировано Ultsch M, et al. ((2016) Sci Rep.6:39374). Варибельные домены 18C5 и CreneFab также имеют одинаковую длину для петель CDR-H1, H2, L1, L2 и L3. Каркасные области V_H (5VZY-VH) и V_L (5VZY-VL) CreneFab были выбраны в качестве акцепторных последовательностей для CDR 18C5. Для

моделирования структуры было использовано программное обеспечение Bioluminate. Это программное обеспечение лицензировано Schrodinger Inc.

[0432] Варианты последовательностей тяжелой и легкой цепей, полученные в результате гуманизации антител, были дополнительно выровнены с последовательностями зародышевой линии человека с использованием инструмента IMGT Domain GapAlign для оценки гуманизованности тяжелой и легкой цепей, как указано в рекомендациях комитета МНН ВОЗ (WHO-INN). (WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (обзор)» (Интернет) 2014. Доступно по: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Остатки были изменены, чтобы выровнять их с соответствующей последовательностью зародышевой линии человека, где это возможно, для повышения гуманизованности. Для гуманизованного варианта VL_v2 была внесена мутация Q45R, чтобы сделать последовательность более похожей на ген IGKV2-30*02 зародышевой линии человека (номер доступа GenBank - CAA77315; SEQ ID NO: 90). Аминокислотные последовательности, состоящие из каркасов CreneFab и CDR 18C5, обозначены гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VL_v1.

[0433] Дополнительные варианты гум18C5-VH и гум18C5-VL были разработаны для обеспечения возможности оценки различных каркасных остатков на их вклад в связывание антигена и иммуногенность. Позиции, рассматриваемые для внесения мутаций, включают те, которые:

- определяют канонические конформации CDR (обобщено в Martin 2010),
- находятся в пределах зоны Вернье (Foote J and Winter G. (1992). *J Mol Biol.* 224(2):487-99),
- локализованы в интерфейсе доменов VH/VL (обобщено в Leger OJP и Saldanha J. (2000). Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting. In: Shepherd P and Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),
- чувствительны к посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование или пироглутаминирование,
- заняты остатками, которые, как предсказано, конфликтуют с CDR, в соответствии с моделью CDR 18C5, внесенных в каркасы Fab Crenezumab, или
- заняты остатками, которые являются редкими среди секвенированных человеческих антител, где либо исходный остаток 18C5 мыши, либо какой-либо другой остаток является гораздо более распространенным.

[0434] Были сконструированы 2 гуманизованных варианта вариабельной области тяжелой цепи и 2 гуманизованных варианта вариабельной области легкой цепи,

содержащие различные перестановки замен: гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VH_v2, (SEQ ID NO: 85-86 соответственно), и гум18C5-VL_v1 и гум18C5-VL_v2_v6 (SEQ ID NO: 91-92 соответственно). (Таблицы 8 и 9). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vk и Vh, с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, показаны в Таблицах 8 и 9, соответственно. Обозначенные жирным шрифтом области в Таблицах 8 и 9 обозначают CDR, определенные по совмещенной Кабата/Чютия. «-» обозначает отсутствие аминокислоты в указанной позиции. SEQ ID NO: 86 и 92 содержат обратные мутации и другие мутации, как показано в Таблице 10. Аминокислоты в позициях гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VH_v2 перечислены в Таблице 11. Аминокислоты в позициях гум18C5-VL_v1 и гум18C5-VL_v2 перечислены в Таблице 12. Процент гуманизации для гуманизированных цепей VH гум18C5-VH_v1 и гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 85-86, соответственно), по отношению к наиболее похожему гену IGHV3-48*01 зародышевой линии человека, и для гуманизированных цепей VL гум18C5-VL_v1 и гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 91-92, соответственно) по отношению к наиболее похожему гену IGKV2-30*02 зародышевой линии человека, показан в Таблице 13.

Таблица 8: Гуманизированные области VL 18C5

<u>№ остатка по линейной нумерации</u>	<u>№ остатка по Кабату</u>	<u>FR или CDR</u>	<u>VL 18C5 мыши (SEQ ID NO: 87)</u>	<u>Акцептор 5VZY-VL huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 89)</u>	<u>гум18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)</u>	<u>гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)</u>
1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V
3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S

8	8	Frl	P	P	P	P
9	9	Frl	L	L	L	L
10	10	Frl	S	S	S	S
11	11	Frl	L	L	L	L
12	12	Frl	P	P	P	P
13	13	Frl	V	V	V	V
14	14	Frl	S	T	T	T
15	15	Frl	L	P	P	P
16	16	Frl	G	G	G	G
17	17	Frl	D	E	E	E
18	18	Frl	Q	P	P	P
19	19	Frl	A	A	A	A
20	20	Frl	S	S	S	S
21	21	Frl	I	I	I	I
22	22	Frl	S	S	S	S
23	23	Frl	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	I	L	I	I
30	27C	CDR-L1	V	V	V	V
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1		-	-	-
34	28	CDR-L1	N	N	N	N
35	29	CDR-L1	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	N	D	N	N
37	31	CDR-L1	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	E	H	E	E
41	35	Fr2	W	W	W	W
42	36	Fr2	Y	Y	Y	Y
43	37	Fr2	L	L	L	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	K	K	K	K

46	40	Fr2	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	Q	Q	R
52	46	Fr2	L	L	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	K	K	K	K
57	51	CDR-L2	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	N	N	N	N
60	54	CDR-L2	R	R	R	R
61	55	CDR-L2	F	F	F	F
62	56	CDR-L2	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F
69	63	Fr3	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V

90	84	Fr3	G	G	G	G
91	85	Fr3	I	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	F	S	F	F
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	S	G	G
98	92	CDR-L3	S	T	S	S
99	93	CDR-L3	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	V	V	V	V
101	95	CDR-L3	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	–	–	–	–
103	95B	CDR-L3	–	–	–	–
104	95C	CDR-L3	–	–	–	–
105	95D	CDR-L3	–	–	–	–
106	95E	CDR-L3	–	–	–	–
107	95F	CDR-L3	–	–	–	–
108	96	CDR-L3	L	W	L	L
109	97	CDR-L3	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G
112	100	Fr4	A	Q	Q	Q
113	101	Fr4	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E
118	106	Fr4	L	I	I	I
119	106A	Fr4	–	–	–	–
120	107	Fr4	K	K	K	K

Таблица 9: Гуманизированные области VH 18C5

№ остатка по линейной нумерации	№ остатка по Кабату	FR или CDR	VH18C5 мыши (SEQ ID NO: 81)	Акцептор 5VZY-VH huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 83)	гум18C5-VH_v1 (SEQ ID NO: 85)	гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 86)
1	1	Frl	E	E	E	E
2	2	Frl	V	V	V	V
3	3	Frl	K	Q	Q	Q
4	4	Frl	L	L	L	L
5	5	Frl	L	V	V	V
6	6	Frl	E	E	E	E
7	7	Frl	S	S	S	S
8	8	Frl	G	G	G	G
9	9	Frl	G	G	G	G
10	10	Frl	G	G	G	G
11	11	Frl	L	L	L	L
12	12	Frl	V	V	V	V
13	13	Frl	Q	Q	Q	Q
14	14	Frl	P	P	P	P
15	15	Frl	G	G	G	G
16	16	Frl	G	G	G	G
17	17	Frl	S	S	S	S
18	18	Frl	L	L	L	L
19	19	Frl	N	R	R	R
20	20	Frl	L	L	L	L
21	21	Frl	S	S	S	S
22	22	Frl	C	C	C	C

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

66	61	CDR-H2	P	D	P	P
67	62	CDR-H2	S	S	S	S
68	63	CDR-H2	L	V	L	L
69	64	CDR-H2	K	K	K	K
70	65	CDR-H2	D	G	D	D
71	66	Fr3	K	R	R	R
72	67	Fr3	F	F	F	F
73	68	Fr3	I	T	T	T
74	69	Fr3	I	I	I	I
75	70	Fr3	S	S	S	S
76	71	Fr3	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	N	N	N	N
79	74	Fr3	A	A	A	A
80	75	Fr3	K	K	K	K
81	76	Fr3	N	N	N	N
82	77	Fr3	T	S	S	S
83	78	Fr3	L	L	L	L
84	79	Fr3	F	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	L	L	L
86	81	Fr3	Q	Q	Q	Q
87	82	Fr3	M	M	M	M
88	82A	Fr3	S	N	N	N
89	82B	Fr3	K	S	S	S
90	82C	Fr3	V	L	L	L
91	83	Fr3	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	A	A	A
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	S	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	L	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C
101	93	Fr3	A	A	A	A
102	94	Fr3	R	S	S	R
103	95	CDR-H3	L	G	L	L
104	96	CDR-H3	G	—	G	G
105	97	CDR-H3	Y	—	Y	Y
106	98	CDR-H3	G	—	G	G
107	99	CDR-H3	N	—	N	N
108	100	CDR-H3	Y	—	Y	Y
109	100A	CDR-H3	G	—	G	G

110	100B	CDR-H3	W	_	W	W
111	100C	CDR-H3	A	_	A	A
112	100D	CDR-H3	L	_	L	L
113	100E	CDR-H3	_	_	_	_
114	100F	CDR-H3	_	_	_	_
115	100G	CDR-H3	_	_	_	_
116	100H	CDR-H3	_	_	_	_
117	100I	CDR-H3	_	_	_	_
118	100J	CDR-H3	_	_	_	_
119	100K	CDR-H3	_	_	_	_
120	101	CDR-H3	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Таблица 10

Обратные мутации V_H, V_L и другие мутации для гуманизированного 18C5

Варианты V _H или V _L	Экзонная акцепторная последовательность V _H или V _L	Изменения в остатках акцепторных каркасов (на основе CDR совмещенной Кабата/Чотиа)
гум18C5-VH_v1 (SEQ ID NO: 85)	Акцептор 5VZY-VH huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY	Нет
гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 86)	Акцептор 5VZY-VH huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY	H37, H45, H47, H48, H49, H94
гум18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)	Акцептор 5VZY-VL huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY	Нет
гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)	Акцептор 5VZY-VL huFrwk (CreneFab) номер доступа 5VZY	L2, L45

Таблица 11

Нумерация по Кабату каркасных остатков (на основе CDR совмещенной Кабата/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 18C5

№ остатка по Кабату	Акцептор 5VZY-VH_huFgwk (CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 83)			
	VH 18C5 мышь (SEQ ID NO: 81)	гум18C5-VH_v1 (SEQ ID NO: 85)	гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 86)	
H37	V	A	V	A
H45	L	Q	L	Q
H47	L	W	L	W
H48	V	I	V	I
H49	A	G	A	G
H94	S	R	S	R

Таблица 12

Нумерация по Кабату каркасных остатков (на основе CDR совмещенной Кабата/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 18C5

№ остатка по Кабату	Акцептор 5VZY-VL_huFgwk (CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 89)			
	VL 18C5 мышь (SEQ ID NO: 87)	гум18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)	гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)	
L2	I	V	I	V
L45	Q	K	Q	R

Таблица 13

Процент гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 18C5

Варианты V _H или V _L	% Гуманизации
гум18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	96,2%
гум18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	93,8%
гум18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	88,6%
гум18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)	92,4%

[0435] Позиции, в которых остатки, являющиеся каноническими классовыми по Чотиа, вернье, или остатками интерфейса/укладки, различаются между акцепторными последовательностями мыши и человека, являются кандидатами на замещение. Примеры остатков канонических классов по Чотиа включают в себя остаток H48 по Кабату в Таблицах 8 и 9. Примеры остатков поверхности интерфейса/укладки (VH+VL) включают в себя остатки H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, и L98 по Кабату в Таблицах 8 и 9.

[0436] Обоснование выбора позиций, указанных в Таблице 8 в вариабельной области легкой цепи, в качестве кандидатов на замещение заключается в следующем.

I2V - обратная мутация канонического остатка по Чотиа.

Q45R - мутация остатка IGKV2-30*02 зародышевой линии. Q редко встречается у человека в этой позиции. R часто встречается в этой позиции.

[0437] гум18C5-VL_v1: Петли CDR-L1, L2, и L3 18C5-VL встроены в каркас CreneFab (5VZY-VL).

[0438] гум18C5-VL_v2: обращает все замены каркаса в позициях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Чотиа, являются частью зоны Вернье, или расположены в интерфейсе доменов VH/VL; гум18C5-VL_v2 содержит обратные мутации I2V и акцептора человека на мутацию Q45R зародышевой линии, что позволяет оценить вклад этих позиций в аффинность и иммуногенность связывания антигена.

[0439] Вариабельные области легкой цепи:

[0440] гум18C5-VL_1 (SEQ ID NO: 91)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0441] гум18C5-VL_2 (SEQ ID NO: 92)

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKV
SNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0442] Обоснование выбора позиций, указанных в Таблице 9 в вариабельной

области тяжелой цепи, в качестве кандидатов на замещение заключается в следующем.

V37A: представляет собой обратную мутацию в зоне Вернье. Val демонстрирует отталкивающее взаимодействие с Trp47.

L45Q: представляет собой обратную мутации остатка интерфейса ядра по Чотиа. Leu в этой позиции имеет отталкивающие Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.

L47W: представляет собой обратную мутацию остатка интерфейса. В мышинном 18C5 Trp находится в позиции 47, и Trp образует водородную связь с Ser 35, тем самым стабилизируя внутрицепные бета-листы. Leu не устанавливает интерфейс с остатками и может дестабилизировать конформацию.

V48I представляет собой обратную мутацию взаимодействующего с CDR остатка зоны Вернье для сохранения этого взаимодействия.

A49G: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

S94R: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье для сохранения взаимодействия CDR.

[0443] *гум18C5-VH_v1*: Петли CDR-H1, H2 и H3 из 18C5-VH встроены в каркас VH CreneFab (5VZY-VH).

[0444] *гум18C5-VH_v2*: обращает все замены каркаса в позициях, которые являются ключевыми для определения канонических классов по Чотиа, являются частью зоны Вернье, или расположены в интерфейсе доменов VH/VL. 18C5-VH_v2 содержит обратные мутации V37A, L45Q, L47W, V48I, A49G и S94R, чтобы сделать возможной оценку вклада этих позиций в аффинность и иммуногенность связывания антигена.

[0445] Вариабельные области тяжелой цепи:

[0446] *гум18C5-VH_1* (SEQ ID NO: 85)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLRFWMSWVRQAPGKGLLELVAEINPG
SSTIN
YTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGT
TVTVSS
```

[0447] *гум18C5-VH_2* (SEQ ID NO: 86)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPG
SSTIN
YTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGT
TVTVSS
```

Перечень последовательностей:

SEQ ID NO: 1

Аминокислотная последовательность VH 18C5 с сигнальным пептидом

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAP
GRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFIISRDNANTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGY
GNYGWALDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 2

нуклеотидная последовательность, кодирующая VH 18C5 мыши с сигнальным пептидом

ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTCATTGTTGCCCTTTTAAAAGGGGTCCAGTGTGAGG
TAAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAATCTCT
CCTGTGTAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGTTGGGCTCGGCAGG
CTCCAGGGAGAGGACAGGAATGGATTGGAGAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGAT
AAACTATACGCCATCTCTGAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAA
ATACGCTGTTCCCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACTCAGCCCTTTATTA
GTGCAAGACTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 3

Аминокислотная последовательность VL 18C5 с сигнальным пептидом

MKLPVRLLVLMFWIPASRSVDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWY
LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLT
FGAGTKLELK

SEQ ID NO: 4

нуклеотидная последовательность, кодирующая VL 18C5 мыши с сигнальным пептидом

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGAAGT
GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCC
TCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTTA
GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC
AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTC
ACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTA
GGTTCACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGTTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO: 5

аминокислотная последовательность CDR-H1 18C5

GFDFSRFWMS

SEQ ID NO: 6

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-H1 18C5

GGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGT

SEQ ID NO: 7

аминокислотная последовательность CDR-H2 18C5

EINPGSSTINYTPSLKD

SEQ ID NO: 8

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-H2 18C5

GAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGAT

SEQ ID NO: 9

аминокислотная последовательность CDR-H3 18C5

LGYGNYGWALDY

SEQ ID NO: 10

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-H3 18C5

CTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTAC

SEQ ID NO: 11

аминокислотная последовательность CDR-L1 18C5

RSSQSIVDSNGNTYLE

SEQ ID NO: 12

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-L1 18C5

AGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTAGAA

SEQ ID NO: 13

аминокислотная последовательность CDR-L2 18C5

KVSNRFS

SEQ ID NO: 14

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-L2 18C5

AAAGTTTCCAACCGATTTTCT

SEQ ID NO: 15

аминокислотная последовательность CDR-L3 18C5

FQGS HVPLT

SEQ ID NO: 16

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-L3 18C5

TTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACG

SEQ ID NO: 17

аминокислотная последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18C5 (IgG1 человека)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
S RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 18

нуклеотидная последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18C5 (IgG1 человека)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
G
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC

A

AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 19

аминокислотная последовательность химерной константной области легкой цепи
18C5 (каппа человека)
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную
последовательность химерной константной области легкой цепи 18C5 (каппа человека)
CGGGGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
A
AATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
A
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
C
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 21

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой
цепи IgG1
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
S RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
S RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
G
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
S RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 24

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области легкой цепи с N-концевым аргинином

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 25

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 26

аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под номером доступа P02766.1 (UniProt)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAAD
DTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTAN
DS GPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 27

аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под номером доступа AAB35639.1 (GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGL
T
TEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 28

аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под номером доступа AAB35640.1 (GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGL
T
TEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 29

аминокислотная последовательность транстиретина человека, представленная под номером доступа ABI63351.1 (GenBank)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAAD
DTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTAN
DS GPRRYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 30

аминокислотная последовательность остатков 101-109 транстиретина человека

GPRRYTIAA

SEQ ID NO: 31

аминокислотная последовательность остатков 87-127 транстиретина человека

FHEHAIEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 32

нуклеотидная последовательность, кодирующая иллюстративную константу
область тяжелой цепи G1m3 IgG1

GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
G
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
A
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 33

нуклеотидная последовательность, кодирующая иллюстративную константную
область легкой цепи с N-концевым аргининомCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
T

CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
T

ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 34

нуклеотидная последовательность, кодирующая иллюстративную константную
область легкой цепи без N-концевого аргинина

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGC
AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
C
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 35

аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области
тяжелой цепи

MNFGLSLIFLVLVKGVQC

SEQ ID NO: 36

нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной
области тяжелой цепи

ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGT

SEQ ID NO: 37

аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области
легкой цепи

MESHTQVFVFLWLSGVDG

SEQ ID NO: 38

нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной

области легкой цепи

ATGGAGTCACATACTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTTGACG
GA

SEQ ID NO: 39

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату 14G8

SYTMS

SEQ ID NO: 40

аминокислотная последовательность CDR-H2 по Кабату 14G8

EINNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 41

аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату 14G8

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 42

аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату 14G8

RSNKSLLSHNGNTYLY

SEQ ID NO: 43

аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату 14G8

RVSNLAS

SEQ ID NO: 44

аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату 14G8

MQHLEYPLT

SEQ ID NO: 45

эпитоп 5A1

ЕНАЕVVFTA

SEQ ID NO: 46

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату 5A1

NYAMS

SEQ ID NO: 47

аминокислотная последовательность CDR-H2 по Кабату 5A1
SISSGGSTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 48

аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату 5A1
YYYGQYFDF

SEQ ID NO: 49

аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату 5A1
KASQDVSTTVA

SEQ ID NO: 50

аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату 5A1
SASYRCT

SEQ ID NO: 51

аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату 5A1
QQHYSTPLT

SEQ ID NO: 52

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату 6C1
NYYMS

SEQ ID NO: 53

аминокислотная последовательность CDR-H2 по Кабату 6C1
YISIDGNNIYHPDSVKG

SEQ ID NO: 54

аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату 6C1
DSDYGYFDV

SEQ ID NO: 55

аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату 6C1
RSSQSIVHSNGNTYLE

SEQ ID NO: 56

аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату 6C1

KVSKRFS

SEQ ID NO: 57

аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату 6C1

FQGSHVPLT

SEQ ID NO: 58

аминокислотная последовательность области VH AD7F6

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWIRQTPDKRLEWVATISSSGTYT
YYTESVKGRFTVSRDNAKNTLSLQMSNLKSDDTAMYCYCTRQAYGREYFDVWGTGTTV
TVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPAL
LQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPSTINPCPPCKECHK
CPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLTPKVTCVVVDVSEDDPDVRIWVFNNEVHTAQ
TQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQV
YILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYS
KLDIKTSTVGENRFLLMQRETRGSEKLLPEEDHLPSPGK

SEQ ID NO: 59

аминокислотная последовательность области VL AD7F6

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFDSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASN
RESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFCKQSNYLRFTFGGGTRVEIKRADAAPT
V
SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDIVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS
MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 60

аминокислотная последовательность CDR-H1 RT24

RYWIT

SEQ ID NO: 61

аминокислотная последовательность CDR-H2 RT24

DIYPGSGRTNYNEKFKN

SEQ ID NO: 62

аминокислотная последовательность CDR-H3 RT24
YYGSTYFYV

SEQ ID NO: 63

аминокислотная последовательность CDR-L1 RT24
RSSKSLLYKDGKTYLN

SEQ ID NO: 64

аминокислотная последовательность CDR-L2 RT24
LMSTRAS

SEQ ID NO: 65

аминокислотная последовательность CDR-L3 RT24
QQLVEYPRT

SEQ ID NO: 66

аминокислотная последовательность CDR-H1 NI-301.35G11
SYAMS

SEQ ID NO: 67

аминокислотная последовательность CDR-H2 NI-301.35G11
SISGSGDTTKYTDSVKG

SEQ ID NO: 68

аминокислотная последовательность CDR-H3 NI-301.35G11
DGSGRIDPFAL

SEQ ID NO: 69

аминокислотная последовательность CDR-L1 NI-301.35G11
RSSRSLVYSDGNIYLN

SEQ ID NO: 70

аминокислотная последовательность CDR-L2 NI-301.35G11

KVSNRDSG

SEQ ID NO: 71

аминокислотная последовательность CDR-L3 NI-301.35G11

MQGTHWPRT

SEQ ID NO: 72

эпитоп MFD101, MFD102, MFD103, MFD105,

ADDTWEPFASGKT

SEQ ID NO: 73

эпитоп MFD107, MFD108, MFD109, MFD111

TSESGELHGLTTE

SEQ ID NO: 74

эпитоп MFD114

ALLSPYSYSTTAV

SEQ ID NO: 75

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 9D5

SYTMS

SEQ ID NO: 76

аминокислотная последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 9D5

EISNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 77

аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 9D5

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 78

аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 9D5

RSSKSLLSHNGNTYL Y

SEQ ID NO: 79

аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 9D5

RVSNLAS

SEQ ID NO: 80

аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 9D5

MQHLEYPLT

SEQ ID NO: 81

аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела 18C5 мыши

EVKLLVESGGGLVQPGGSLNLSVCVASFDFSRFWMSWARQAPGRGQEWIGEINPGSSTIN
YTPSLKDKFIISRDNKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTSV
TVSS

SEQ ID NO: 82

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела Fab c#17 анти-пироглутамат-Абета мыши

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYSI
YYADTVTGRFTISRRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARYDYDNILDYVMDYWGQG
TSVTVSS

SEQ ID NO: 83

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного Fab Crenezumab (CreneFab) PDB: 5VZY

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLELVAISNSGGSTY
YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 84

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи последовательности IGHV3-48*01 зародышевой линии человека

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 85

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VH_1.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWVRQAPGKGLLELVAEINPGSSTIN
YTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGT
TVVSS

SEQ ID NO: 86

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VH_2.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPGSSTIN
YTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGT
TVVSS

SEQ ID NO: 87

аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи
антитела 18C5 мыши

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NR
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 88

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела Fab
с#17 анти-пироглутамат-Абета мыши

DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 89

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
гуманизированного Fab Crenezumab (CreneFab) PDB: 5VZY

DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLVYSNGD TYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 90

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
последовательности IGKV2-30*2 зародышевой линии человека

DVVMQTQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS NR
D SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGT HWPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 91

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL_1
DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 92

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL_2
DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 93

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 18C5 мыши
RFWMS

SEQ ID NO: 94

аминокислотная последовательность CDR-H1 по Чотиа антитела 18C5 мыши
GFDFSRF

SEQ ID NO: 95

аминокислотная последовательность контакта CDR-H1 антитела 18C5 мыши
SRFWMS

SEQ ID NO: 96

аминокислотная последовательность CDR-H2 по Чотиа антитела 18C5 мыши
NPGSST

SEQ ID NO: 97

аминокислотная последовательность АтМ CDR-H2 антитела 18C5 мыши
EINPGSSTIN

SEQ ID NO: 98

аминокислотная последовательность контакта CDR-H2 антитела 18C5 мыши

WIGGINPGSSTIN

SEQ ID NO: 99

аминокислотная последовательность контакта CDR-H3 антитела 18C5 мыши
ARLGYGNYGWALD

SEQ ID NO: 100

аминокислотная последовательность контакта CDR-L1 антитела 18C5 мыши
NTYLEWY

SEQ ID NO: 101

аминокислотная последовательность контакта CDR-L2 антитела 18C5 мыши
LLIYKVSNR

SEQ ID NO: 102

аминокислотная последовательность контакта CDR-L3 антитела 18C5 мыши
FQGSHPVPL

SEQ ID NO: 103

Аминокислотная последовательность VH 9D5 мыши
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMWVRQTPEKRLELVAEISNSGDTTY
YPTVKGRFTFSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWG
TGTTVTVSS

SEQ ID NO: 104

Аминокислотная последовательность VL 9D5 мыши
DIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSKLLHSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRVSNLA
SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения неправильно свернутого транстриетина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя:

(а) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(b) обнаружение репортерного антитела, которое формирует сэндвич-комплекс на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, несущего мутацию, выбранную из группы, состоящей из: V30M, Y114C, G47R, S50I, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q, и V122I.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутацию выбирают из группы, состоящей из: V30M, Y114C и S50I.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутация представляет собой V30M.

6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутация представляет собой Y114C.

7. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутация представляет собой S50I.

8. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутация представляет собой E89K.

9. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мутация представляет собой E89Q.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело.

12. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что репортерное антитело представляет собой 18C5, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или их химерный вариант или гуманизированный вариант, или поликлональное анти-ТТР антитело.

13. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что захватывающее антитело

25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой MFD109, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой MFD111, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

27. Способ по п. 1, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

28. Способ по пп. 1-10, отличающийся тем, что репортерное антитело представляет собой антитело, которое связывается в пределах остатков 101-109, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, или 115-127 ТТР.

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что неправильно свернутый ТТР содержит замену E89K.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что неправильно свернутый ТТР содержит замену E89Q.

31. Способ по пп. 1-30, отличающийся тем, что биологический образец представляет собой первую аликвоту собранного образца, и способ дополнительно включает в себя повторение стадии (а) и (b) со второй аликвотой собранного образца, дополнительно содержащей исследуемое антитело, которое конкурирует с захватывающим антителом за связывание с ТТР, причем уменьшенное количество репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс при повторении стадий, обеспечивает выявление способности исследуемого антитела связываться с неправильно свернутым ТТР.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что исследуемое антитело представляет собой 14G8, или его химерную или гуманизированную форму, захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что исследуемое антитело представляет собой гуманизированную форму 14G8.

34. Способ обнаружения *in vivo* связывания с целью исследуемого антитела, вводимого субъекту, целью которого является эпитоп в пределах остатков 89-97 неправильно свернутого транстиретина (н-свер-ТТР), путем обнаружения н-свер-ТТР, остающегося в биологическом образце из субъекта, леченного исследуемым антителом, причем способ включает в себя:

(a) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в ТТР, отличающимся от такового захватывающего антитела; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(b) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, несущего мутацию, в выбранную из группы, состоящей из: V30M, Y114C, G47R, S50I, T49S, F33V, A45T, E89K, E89Q, и V122I.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутацию выбирают из группы, состоящей из V30M, Y114C и S50I.

38. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутация представляет собой V30M.

39. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутация представляет собой Y114C.

40. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутация представляет собой S50I.

41. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутация представляет собой E89K.

42. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутация представляет собой E89Q.

43. Способ по п. 34 или 35, отличающийся тем, что уменьшение обнаружения неправильно свернутого ТТР у леченного субъекта по сравнению с обнаружением неправильно свернутого ТТР в биологическом образце из нелеченного субъекта коррелирует с положительным связыванием с целью и лечением субъекта тем же или меньшим количеством исследуемого антитела.

44. Способ по п. 35, отличающийся тем, что леченный субъект и нелеченный субъект являются одним и тем же индивидом.

45. Способ по п. 34, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5 и репортерное антитело представляет собой 9D5, причем захватывающее антитело и репортерное антитело имеют разные метки.

46. Способ по п. 34, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой 14G8.

47. Способ по п. 34, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой 5A1.

48. Способ по п. 34, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 9D5, и репортерное антитело представляет собой 6C1.

49. Способ по п. 45, отличающийся тем, что репортерное антитело конкурирует за связывание с захватывающим антителом, за связывание мультимерного неправильно свернутого транстиретина.

50. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что репортерное антитело имеет электрохемилюминесцентную метку и обнаруживается с помощью электрохемилюминесценции.

51. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что захватывающее антитело имеет биотиновую метку.

52. Способ по любому из предыдущих пунктов, выполненный путем количественной оценки.

53. Способ по любому из предыдущих пунктов, выполненный путем количественной оценки, чтобы выявить абсолютное или относительное количество неправильно свернутого ТТР.

54. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе перед стадией приведения в контакт.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе через линкер.

56. Способ по п. 54, отличающийся тем, что твердая фаза содержит по меньшей мере один электрод.

57. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий в себя: сравнение сигнала от репортерного антитела с сигналом от репортерного антитела в контрольном образце, содержащем известное количество неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

58. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий в себя сравнение сигнала от репортерного антитела из калибровочной кривой сигнала с количеством неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

59. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что сигнал от репортерного антитела пропорционален количеству неправильно свернутого ТТР в образце.

60. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой образец из человека.

61. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой жидкость организма.

62. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой плазму человека.

63. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что наличие неправильно свернутого ТТР используется для постановки диагноза субъекту, из которого был получен образец, транстретин-опосредованного амилоидоза.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что транстретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстретиновый амилоидоз или спорадический транстретиновый амилоидоз дикого типа.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что субъект был идентифицирован как имеющий риск наследственного транстретинового амилоидоза на основании генетического тестирования.

66. Способ по п. 64, отличающийся тем, что у субъекта не проявляются симптомы наследственного транстретинового амилоидоза.

67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что субъект не имеет полиневропатии или кардиомиопатии.

68. Способ по п. 64, отличающийся тем, что наследственный транстретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).

69. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента, получающего лечение транстретин-опосредованного амилоидоза.

70. Способ коррективы лечения субъекта с транстретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя

(а) сравнение количества неправильно свернутого ТТР, обнаруженного способом по п. 34 или 35, в образце из субъекта, ранее леченного от транстретин-опосредованного амилоидоза, с количеством неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта до лечения или в течение более ранней стадии лечения; и

(b) увеличение дозы или частоты введения предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР такое же или больше, чем ранее обнаруженное; или

(c) уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР

меньше, чем ранее обнаруженное.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что предварительное лечение выполняют путем внутривенного введения анти-ТТР антитела, и если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное, предшествующее лечение прекращают и заменяют лечением стабилизатором ТТР, терапией на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапии с РНК-интерференцией, или комбинированной терапией с доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой.

72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом.

73. Способ по п. 71, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.

74. Способ по п. 71, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал.

75. Способ по п. 71, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.

76. Способ по п. 71, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

77. Способ по п. 71, отличающийся тем, анти-ТТР антитело представляет собой 14G8.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом.

79. Способ по п. 77, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.

80. Способ по п. 77, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал.

81. Способ по п. 77, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.

82. Способ по п. 77, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

83. Способ коррекции лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя

(а) сравнение величины связывания репортерного антитела, определенной с помощью способа по п. 51, в образце из субъекта, до начала лечения транстиретин-опосредованного амилоидоза, с величиной связывания репортерного антитела, определенной у субъекта после начала лечения; и

(b) увеличение дозы или частоты введения препарата, если величина связывания репортерного антитела такая же или больше, чем ранее определенная; или

(c) уменьшение дозы или частоты введения препарата, или прекращение препарата, если величина связывания репортерного антитела меньше, чем ранее определенная.

84. Способ по любому из пп. 1-69, отличающийся тем, что транстретин-опосредованный амилоидоз отличают от амилоидоза с амилоидом легкой цепи (AL).

85. Способ по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что образец берут из трансгенной мыши с трансгеном, экспрессирующим ТТР человека.

86. Способ определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце; включающий в себя:

(a) разделение биологического образца на две части;

(b) обнаружение совокупного неправильно свернутого ТТР в первой части биологического образца путем

(i) приведения в контакт первой части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(ii) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (b)(i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР;

(c) обнаружение совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР во второй части биологического образца путем

(i) приведения в контакт второй части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 89-97 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(ii) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (c)(i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР;

(d) вычисление соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР из (c) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР из (b).

87. Способ обнаружения неправильно свернутого транстиретина (ТТР) в биологическом образце, включающий в себя:

(a) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(b) обнаружение репортерного антитела, которое связывается с неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР, несущего мутацию, выбранную из группы, состоящей из: V30M, Y114C, и S50I.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что мутация представляет собой V30M.

91. Способ по п. 89, отличающийся тем, что мутация представляет собой Y114C.

92. Способ по п. 89, отличающийся тем, что мутация представляет собой S50I.

93. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5.

94. Способ по п. 93, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой поликлональное анти-ТТР антитело.

95. Способ по любому из пп. 87-93, отличающийся тем, что репортерное антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

96. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой 9D5, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

97. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой 14G8, или его химерный вариант

собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой MFD107, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

110. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой MFD108, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

111. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой MFD109, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

112. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой MFD1187, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

113. Способ по п. 87, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, и репортерное антитело представляет собой MFD114, или его химерный вариант или гуманизированный вариант.

114. Способ по любому из пп. 87-93, отличающийся тем, что репортерное антитело представляет собой антитело, которое связывается в пределах остатков 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127 или 115-127 ТТР.

115. Способ обнаружения *in vivo* связывания с целью исследуемого антитела, вводимого субъекту, целью которого является эпитоп в пределах остатков 101-109 неправильно свернутого транстиретина (н-свер-ТТР), путем обнаружения н-свер-ТТР, остающегося в биологическом образце из субъекта, леченного исследуемым антителом, причем способ включает в себя:

(а) приведение в контакт биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в ТТР, отличающимся от такового захватывающего антитела; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(b) обнаружение репортерного антитела, формирующего сэндвич-комплекс на стадии (а), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР.

116. Способ по п. 115, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента с наследственным АТТР.

117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что биологический образец получен от

пациента с наследственным АТТР, несущего мутацию, выбранную из группы, состоящей из: V30M, Y114C, и S50I.

118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что мутация представляет собой V30M.

119. Способ по п. 117, отличающийся тем, что мутация представляет собой Y114C.

120. Способ по п. 117, отличающийся тем, что мутация представляет собой S50I.

121. Способ по п. 115 или 116, отличающийся тем, что захватывающее антитело представляет собой 18C5, при этом захватывающее антитело и репортерное антитело имеют разные метки.

122. Способ по п. 115, отличающийся тем, что репортерное антитело конкурирует за связывание с захватывающим антителом, за связывание мультимерного неправильно свернутого транстиретина.

123. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что репортерное антитело имеет электрохемилюминесцентную метку и обнаруживается с помощью электрохемилюминесценции.

124. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что захватывающее антитело имеет биотиновую метку.

125. Способ по любому из предыдущих пунктов, выполненный путем количественной оценки.

126. Способ по любому из предыдущих пунктов, выполненный путем количественной оценки для выявления абсолютного или относительного количества неправильно свернутого ТТР.

127. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе перед стадией приведения в контакт.

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что захватывающее антитело присоединяют к твердой фазе через линкер.

129. Способ по п. 127, отличающийся тем, что твердая фаза содержит по меньшей мере один электрод.

130. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий в себя: сравнение сигнала от репортерного антитела с сигналом от репортерного антитела в контрольном образце, содержащем известное количество неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно свернутого ТТР в образце.

131. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий в себя сравнение сигнала от репортерного антитела из калибровочной кривой сигнала с количеством неправильно свернутого ТТР, для определения количества неправильно

свернутого ТТР в образце.

132. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что сигнал от репортерного антитела пропорционален количеству неправильно свернутого ТТР в образце.

133. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой образец из человека.

134. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой жидкость организма.

135. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец представляет собой плазму человека.

136. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что наличие неправильно свернутого ТТР используется для постановки диагноза субъекту, из которого был получен образец, с транстиретин-опосредованным амилоидозом.

137. Способ по п. 136, отличающийся тем, что транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз дикого типа.

138. Способ по п. 137, отличающийся тем, что субъект был идентифицирован как имеющий риск наследственного транстиретинового амилоидоза на основании генетического тестирования.

139. Способ по п. 137, отличающийся тем, что у субъекта не проявляются симптомы наследственного транстиретинового амилоидоза.

140. Способ по п. 139, отличающийся тем, что субъект не имеет полиневропатии или кардиомиопатии.

141. Способ по п. 137, отличающийся тем, что наследственный транстиретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).

142. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что биологический образец получен от пациента, получающего лечение транстиретин-опосредованного амилоидоза.

143. Способ коррективки лечения субъекта с транстиретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя

(а) сравнение количества неправильно свернутого ТТР, обнаруженного способом по п. 25, в образце из субъекта, ранее леченного от транстиретин-опосредованного амилоидоза, с количеством неправильно свернутого ТТР, обнаруженного у субъекта до

лечения или в течение более ранней стадии лечения; и

(b) увеличение дозы или частоты введения предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР такое же или больше, чем ранее обнаруженное; или

(c) уменьшение дозы или частоты введения предшествующего препарата, или прекращение предшествующего препарата, если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное.

144. Способ по п. 143, отличающийся тем, что предварительное лечение выполняют путем внутривенного введения анти-ТТР антитела, и если количество неправильно свернутого ТТР меньше, чем ранее обнаруженное, предшествующее лечение прекращают и заменяют лечением стабилизатором ТТР, терапией на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапии с РНК-интерференцией, или комбинированной терапией с доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой.

145. Способ по п. 144, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом.

146. Способ по п. 144, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.

147. Способ по п. 144, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал.

148. Способ по п. 144, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.

149. Способ по п. 144, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

150. Способ по п. 144, отличающийся тем, анти-ТТР антитело представляет собой 14G8.

151. Способ по п. 150, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение анти-ТТР антителом.

152. Способ по п. 150, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.

153. Способ по п. 150, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал.

154. Способ по п. 150, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.

155. Способ по п. 150, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

156. Способ корректировки лечения субъекта с транстретин-опосредованным амилоидозом, включающий в себя

(a) сравнение величины связывания репортерного антитела, определенной с помощью способа по п. 46, в образце из субъекта, до начала лечения транстретин-опосредованного амилоидоза, с величиной связывания репортерного антитела, определенной у субъекта после начала лечения; и

(b) увеличение дозы или частоты введения препарата, если величина связывания репортерного антитела такая же или больше, чем ранее определенная; или

(c) уменьшение дозы или частоты введения препарата, или прекращение препарата, если величина связывания репортерного антитела меньше, чем ранее определенная.

157. Способ по любому из пп. 87-142, отличающийся тем, что транстретин-опосредованный амилоидоз отличают от амилоидоза с амилоидом легкой цепи (AL).

158. Способ по любому из пп. 87, отличающийся тем, что образец берут из трансгенной мыши с трансгеном, экспрессирующим ТТР человека.

159. Способ определения соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого транстретина (ТТР) и уровня совокупного неправильно свернутого ТТР в биологическом образце, включающий в себя:

(a) разделение биологического образца на две части;

(b) обнаружение совокупного неправильно свернутого ТТР в первой части биологического образца путем

(i) приведения в контакт первой части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерным антителом, которое специфически связывается с другим эпитопом ТТР; при этом, если неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с неправильно свернутым ТТР на стадии (i), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия неправильно свернутого ТТР;

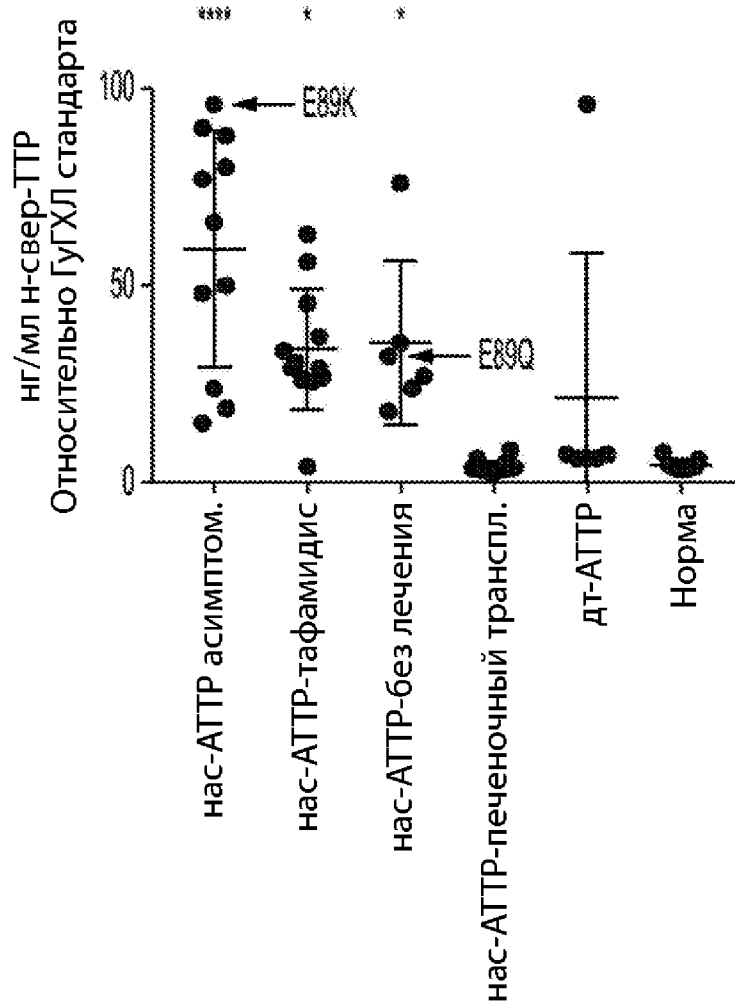
(c) обнаружение совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР во второй части биологического образца путем

(i) приведения в контакт второй части биологического образца с захватывающим антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109, и репортерным антителом, которое специфически связывается с эпитопом в пределах

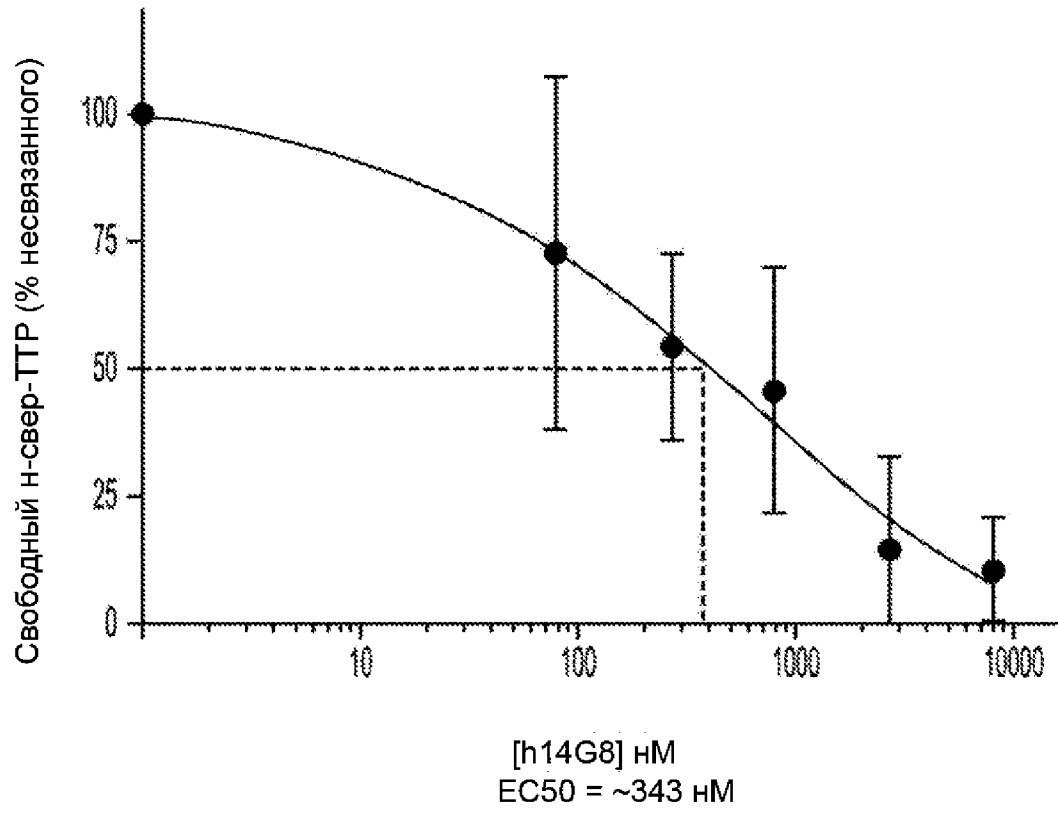
остатков 101-109 ТТР; при этом, если мультимерный неправильно свернутый ТТР присутствует в образце, захватывающее антитело и репортерное антитело связываются с мультимерным неправильно свернутым ТТР, формируя сэндвич-комплекс; и

(ii) обнаружение репортерного антитела, связанного с мультимерным неправильно свернутым ТТР на стадии (a), если таковой присутствует, для выявления наличия или отсутствия мультимерного неправильно свернутого ТТР;

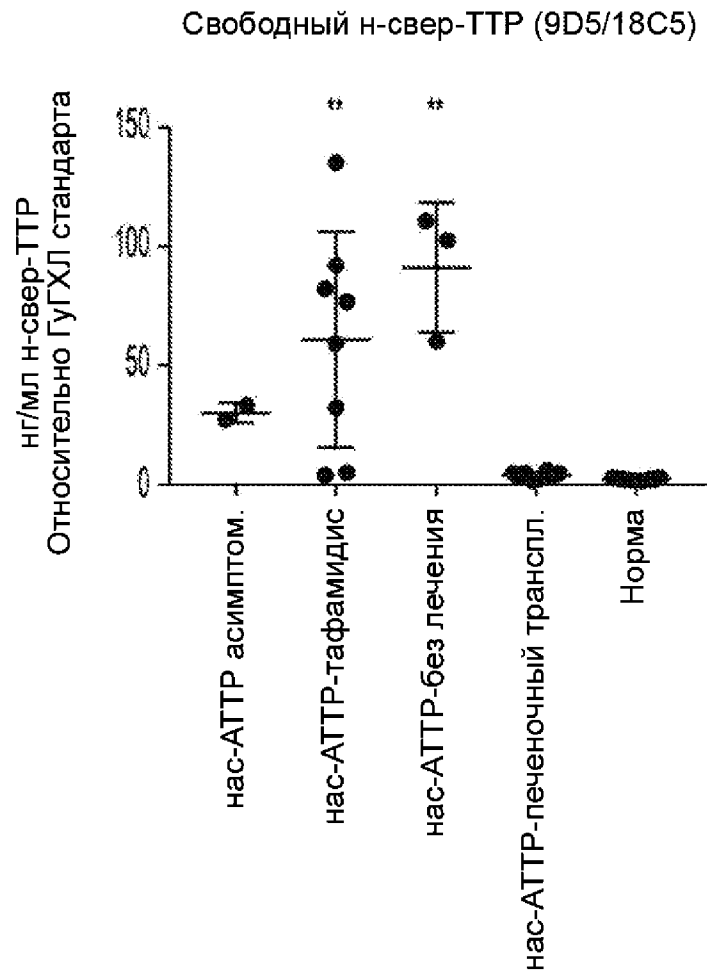
(d) вычисление соотношения уровня совокупного мультимерного неправильно свернутого ТТР из (c) к уровню совокупного неправильно свернутого ТТР из (b).



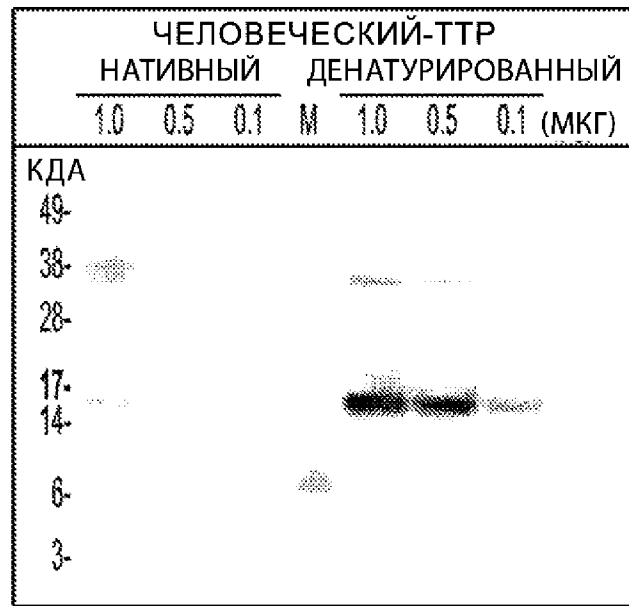
Фиг. 1



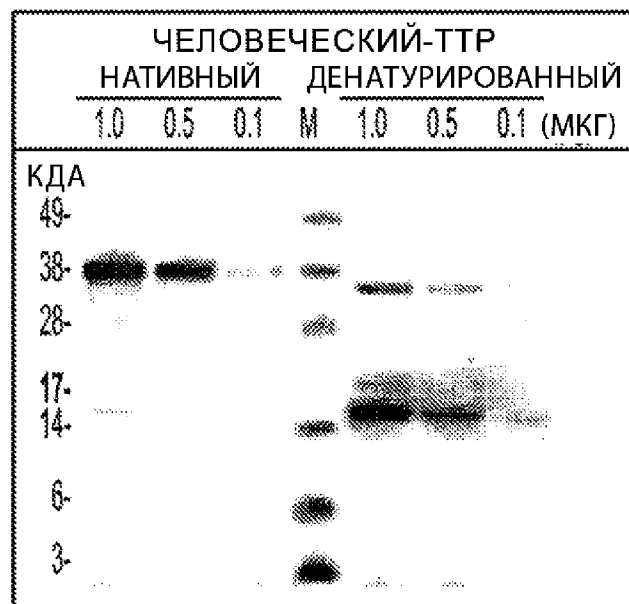
Фиг. 2



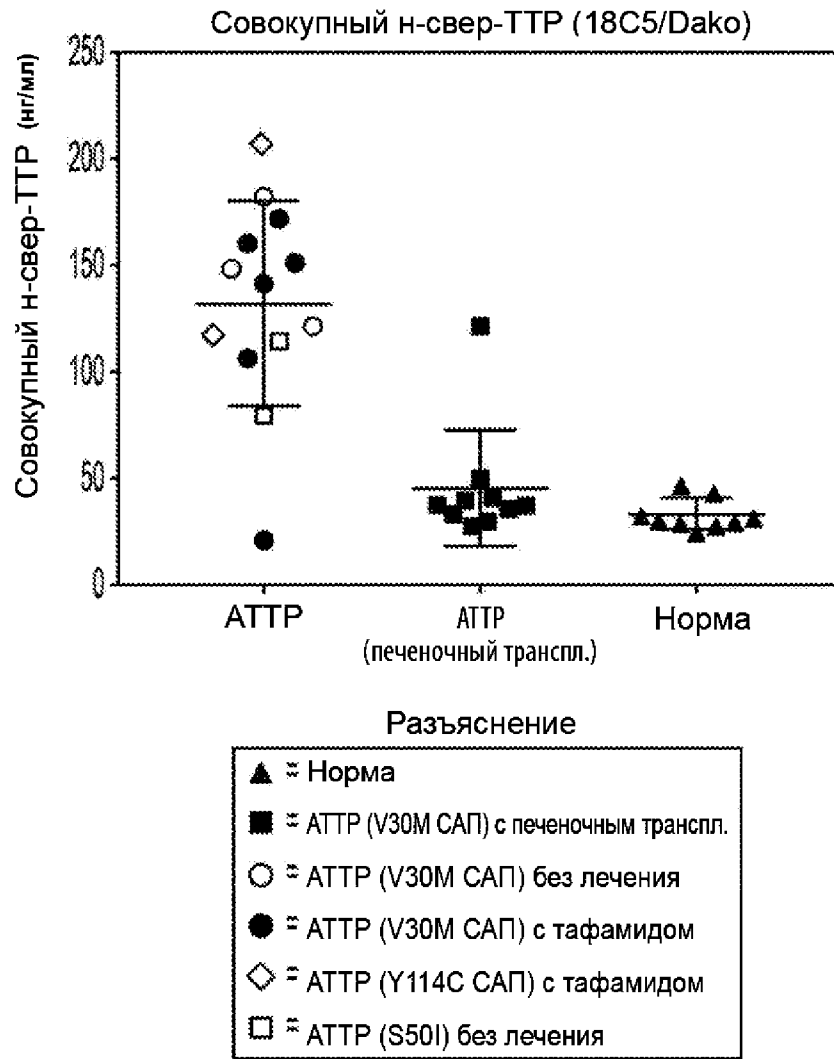
Фиг. 3



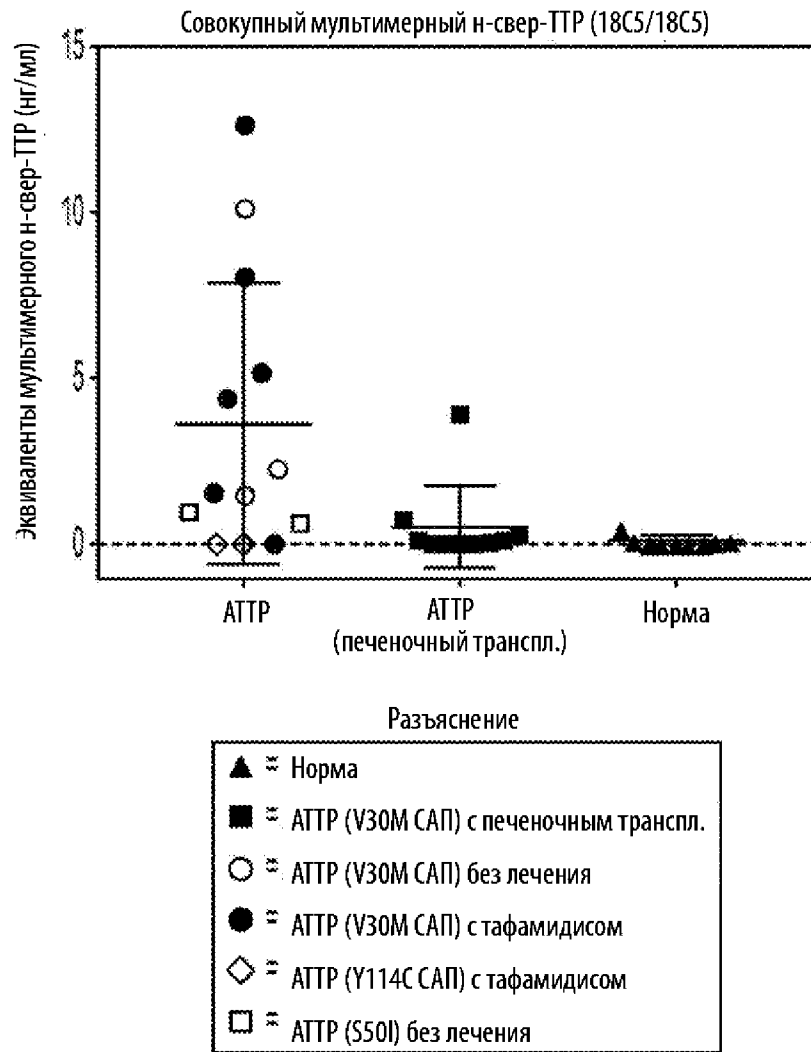
Фиг. 4



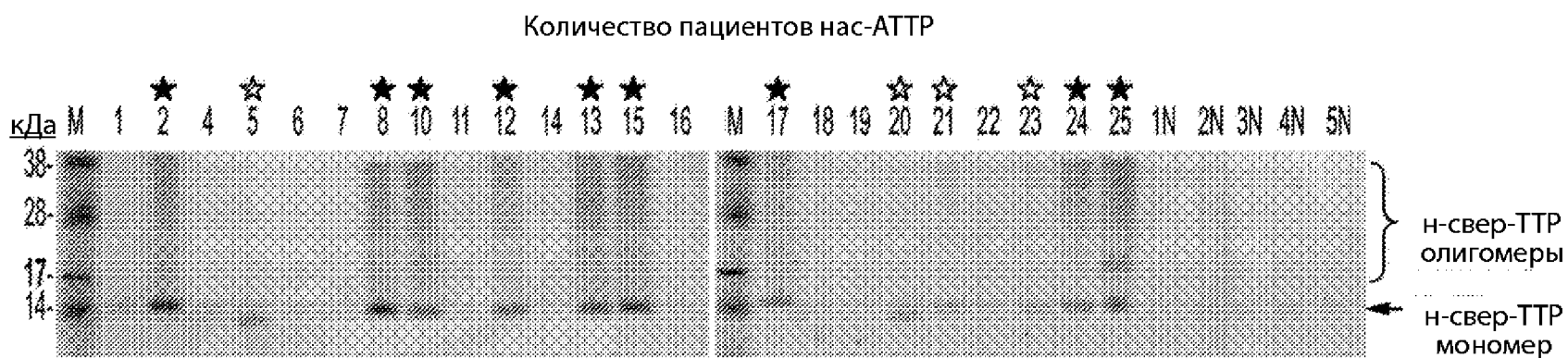
Фиг. 5



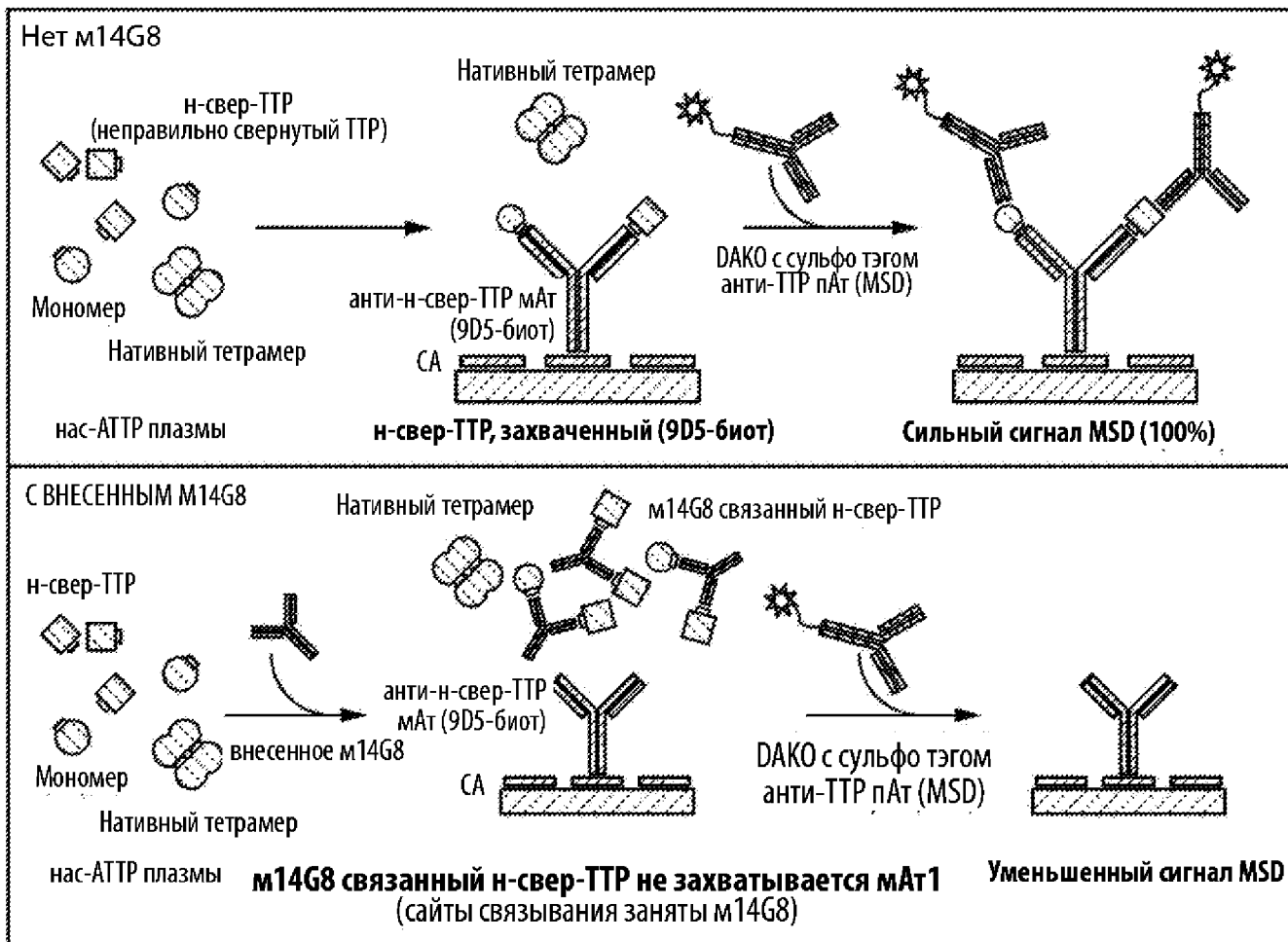
Фиг. 6



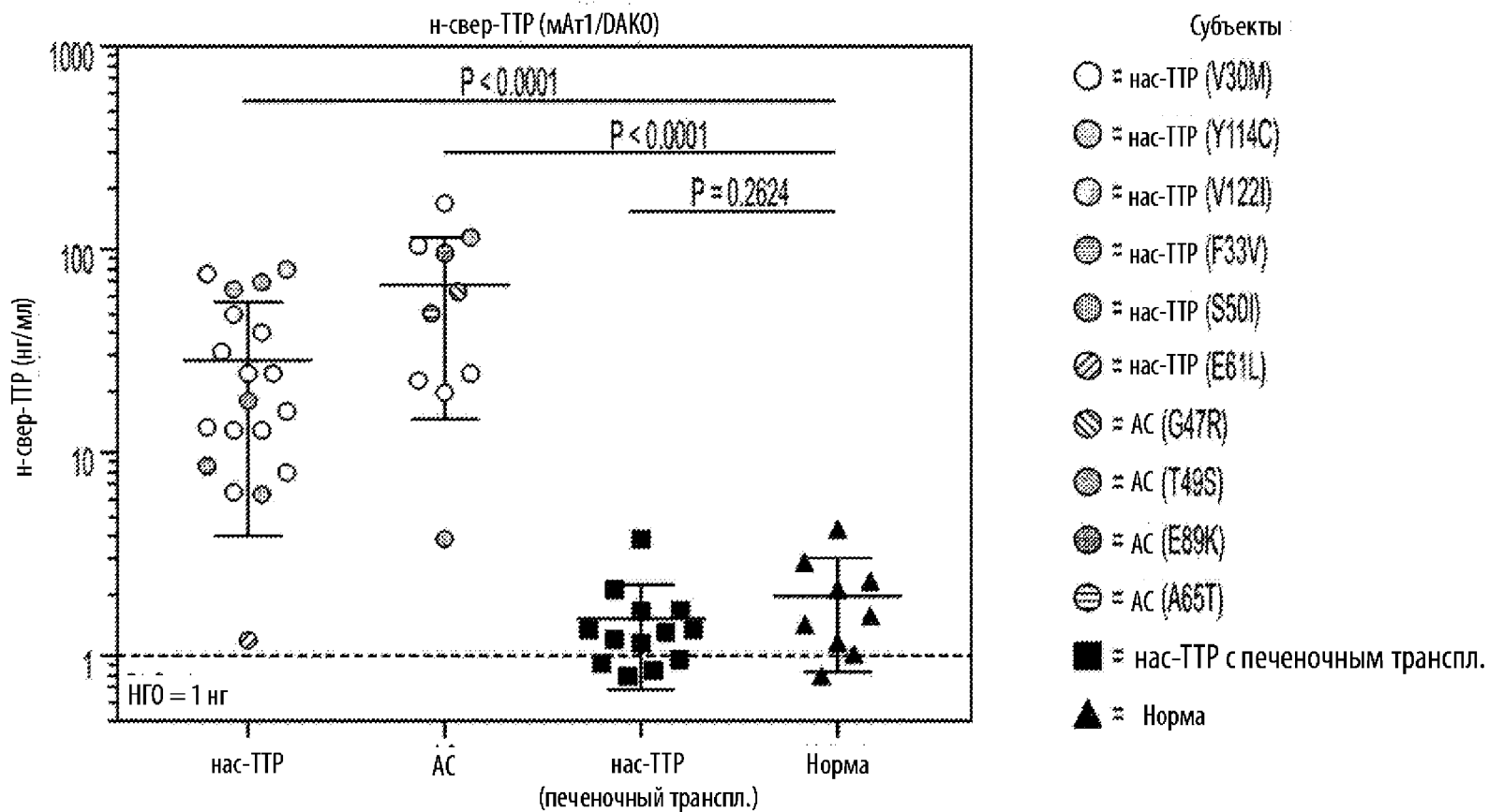
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

	-----+-----+-----+-----+-----+-----	
	10 20 30 40 50 60	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----	
18C5VH_Pro	EVKILLESGGGLVQPPGGLNLSCVYASGFDPSRFWMSNARQAPGKGGQZNIKEINPGSSTINYTPSLK	65
IGHV3-48*01	EVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFTYSSYGMNWRQAPGKGLNWSYISSSSSTIYYADSVK	65
CreneFab_VH	EVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFTYSSYGMNWRQAPGKGLNWSYISSSSSTIYYADSVK	65
гум18C5Vh1	EVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFDPSRFWMSNARQAPGKGLNVAEINPGSSTINYTPSLK	65
гум18C5Vh2	EVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFDPSRFWMSNARQAPGKGGQZNIKEINPGSSTINYTPSLK	65
	-----+-----+-----+-----+-----+-----	
	70 80 90 100 110 120	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----	
18C5VH_Pro	DEFTISRDNAKNTLEFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGNALDYWGQGTSTVTVSS	121
IGHV3-48*01	GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVFYCARY-----P-DYWGQGTITLVSS	113
CreneFab_VH	GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVFYCASG-----DYWGQGTITLVSS	112
гум18C5Vh1	DEFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVFYCASLGYGNYGNALDYWGQGTITVTVSS	121
гум18C5Vh2	DEFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVFYCARLGYGNYGNALDYWGQGTITVTVSS	121

Фиг. 11

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10 20 30 40 50 60 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+	
18C5VL_pro	DVLENTQTPLSLEPVSICDQASISCRSSQSIVDSNNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF	60
IGKV2-30*02	DVLENTQSPLSLPVTLQQPASISCRSSQSLVHSQGNVYLANWQQQRFQSPKRLIYKVSNRD	60
crenefab-VL	DIVNTQSPLSLPVTFCBPASISCRSSQSIVDSNNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF	60
гум18C5VLv1	DIVNTQSPLSLPVTFCBPASISCRSSQSIVDSNNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF	60
гум18C5VLv2	DVLENTQSPLSLPVTLQQPASISCRSSQSIVDSNNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF	60
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 70 80 90 100 110 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+ -----+-----+-----+-----+-----+-----+	
18C5VL_pro	SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSSTVPLTFCAGTKLELK	112
IGKV2-30*02	SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTMFTTFGQGTKEIK	112
crenefab-VL	SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISKVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTVEIK	112
гум18C5VLv1	SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSSTVPLTFCAGTKLELK	112
гум18C5VLv2	SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISKVEAEDVGVYYCFQGSSTVPLTFCAGTKVEIK	112

Фиг. 12