- (43) Дата публикации заявки 2020.07.06
- (22) Дата подачи заявки 2018.10.05

(51) Int. Cl. A01K 67/027 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01) **A61K 49/00** (2006.01)

### (54) АНТИТРАНСТИРЕТИНОВЫЕ АНТИТЕЛА

- (31) 62/569,436; 62/598,965
- (32) 2017.10.06; 2017.12.14
- (33) US
- (86) PCT/US2018/054720
- (87) WO 2019/071205 2019.04.11
- (71) Заявитель: ПРОТЕНА БИОСАЙЕНСИС ЛИМИТЕД (IE)
- **(72)** Изобретатель:

Солменс Джошуа Реджинальд, Александер Светлана, Барбур Робин, Хигаки Джеффри Н., Ниджджар Тарлохан С. (US)

- (74) Представитель:Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.(RU)
- (57) Данное изобретение обеспечивает антитела, которые специфически связываются с транстиретином (ТТР). Указанные антитела могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболеваний или нарушений, связанных с накоплением ТТР или накоплением отложений ТТР (например, амилоидоза ТТР). Указанные антитела также могут быть использованы для диагностики амилоидоза ТТР, ингибирования или уменьшения агрегации ТТР и для мониторинга эффективности терапий ТТР, среди других применений.

	HAT	Ч ИВНЬ			ЧЕСКИЙ-ТТР ДЕНАТУРИРОВАННЫЙ			
	1.0	0.5	0.1	M	1.0	0.5	0.1	(WKL)
кДа 49-								
38-	18 (Mar)				9900000			
28-								
17· 14·	4				***		Talasia.	ř
6-				40				
3-								

#### АНТИ-ТРАНСТИРЕТИНОВЫЕ АНТИТЕЛА

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет согласно §119(e) раздела 35 Кодекса Законов США по предварительной заявке США № 62/569436, поданной 6 октября 2017 года, и предварительной заявке США № 62/598965, поданной 14 декабря 2017 года, каждая из которых включена посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

# ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Перечень последовательностей, записанный в файл 516711SEQLST.txt, имеет размер 59,6 килобайта, был создан 20 сентября 2018 года, и 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 сворачивания 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 предложено выделенное моноклональное антитело, которое специфически связывается с неправильно свернутым

TTP, но не с нативной формой белка. Примеры таких антител связываются с эпитопом в пределах аминокислотных остатков 101-109 зрелой области SEQ ID NO: 26.

[0006] Некоторые такие антитела конкурируют за связывание с неправильно свернутым TTP человека с антителом 18C5. Некоторые такие антитела связываются с тем же эпитопом на транстиретине человека, что и 18C5.

[0007] Некоторые такие антитела содержат три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 18С5, причем 18С5 представляет собой антитело мыши, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 81, и зрелой вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87.

[0008] Некоторые такие антитела содержат три CDR тяжелой цепи, как определено по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 5, 7 и 9), и три CDR легкой цепи, как определено по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 11, 13, и 15).

[0009] Некоторые такие антитела представляют собой 18С5 или его химерную, венированную или гуманизированную форму. Некоторые такие антитела связываются с эпитопом в позициях 101-109 в зрелой области SEQ ID NO: 26. Некоторые такие антитела являются моноклональными антителами. Некоторые такие антитела представляют собой химерные, гуманизированные, венированные или человеческие антитела. В некоторых таких антителах зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет ≥85% идентичности с последовательностью человека. В некоторых таких антителах зрелая вариабельная область легкой цепи имеет ≥85% идентичности с последовательностью человека. В некоторых таких антителах каждая природная вариабельная область тяжелой цепи и легкой цепей имеет ≥85% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека.

Некоторые такие антитела являются гуманизированными антителами. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG1 человека. Некоторые такие антитела имеют изотип IgG2 или IgG4 человека.

[0010] Некоторые такие антитела представляют собой гуманизированные или химерные антитела 18С5, которые специфически связываются с транстиретином, причем 18С5 представляет собой антитело мыши, характеризующееся зрелой вариабельной областью

тяжелой цепи SEQ ID NO: 81 и зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 87. В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 18C5, и гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 18C5.

[0011] В некоторых антителах, CDR соответствуют определению, выбранному из группы по Кабату, по Чотиа, по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа, АтМ и системе контакта. В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи 18C5 по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 5, 7 и 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи 18C5 по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 11, 13 и 15). В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Кабату 18C5 (SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Кабату 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15). В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Чотиа 18C5 (SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Чотиа 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15). В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по ATM 18C5 (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по AtM 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15). В некоторых антителах, гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по определению контакта 18C5 (SEQ ID NO: 100-102), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по определению контакта 18C5 (SEQ ID NO: 95. SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99).

[0012] Некоторые антитела содержат гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92.

[0013] В некоторых антителах, по меньшей мере, одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано: Н37 занята V или A, H45 занята L или Q, H47 занята L или W, H48 занята L или I, H49 занята A или G, а H94 занята S или R. В некоторых антителах, позиции H37, H45, H47, H48, H49 и H94 в области VH заняты A, Q, W, I, G и R соответственно.

[0014] В некоторых антителах, по меньшей мере, одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано: L2 занята I или V, а L45 занята Q или R. В некоторых антителах, позиции L2 и L45 в области VL заняты V и R, соответственно.

[0015] Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92. Некоторые антитела содержат зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92.

[0016] В некоторых антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 91-92.

[0017] В некоторых антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91. В некоторых антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92. В некоторых антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91. В некоторых антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

[0018] В некоторых антителах, антитело является интактным антителом. В некоторых антителах, антитело является связывающим фрагментом. В некоторых таких антителах, связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab, или фрагмент Fab'2.

[0019] В некоторых антителах, зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, и зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи. В некоторых таких антителах, константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая имеет уменьшенное связывание с рецептором Гсү относительно природной константной области тяжелой цепи человека. В некоторых таких антителах, константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1. В некоторых таких антителах, зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 22, и/или зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 24.

[0020] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая первое антитело по любому из предыдущих пунктов, второе антитело, которое связывается с эпитопом ТТР, отличающимся от того, с которым связывается 18С5, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых таких фармацевтических композициях, второе антитело представляет собой 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. В некоторых таких фармацевтических композициях, второе 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 TTP.

[0021] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложено биспецифическое антитело, содержащее две антиген-связывающие области, первый антиген-связывающий домен, который специфически связывается в пределах 101-109 ТТР, и второй антиген-связывающий домен, который специфически связывается с другой областью ТТР. В некоторых таких биспецифических антителах, второй антиген-связывающий домен представляет собой антиген-связывающий домен из 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109,

MFD111, MFD114, или его химерного варианта или гуманизированного варианта. В некоторых таких биспецифических антителах, второй антиген-связывающий домен 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 TTP.

[0022] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из вышеупомянутых новых антител и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из вышеупомянутых антител. В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий такую нуклеиновую кислоту. В другом аспекте, согласно данному изобретению предложена клетка-хозяин, трансформированная таким рекомбинантным вектором экспрессии.

[0024] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ гуманизации антитела, включающий в себя:

- (а) выбор акцепторного антитела человека;
- (b) идентификацию аминокислотных остатков антитела мыши, которые должны быть сохранены;
- (c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и
- (d) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела;

при этом антитело мыши содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

[0025] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ получения гуманизированного, химерного или венированного антитела, включающий в себя:

- (a) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела, так что клетки секретируют антитело; и
- (b) очистку антитела от среды для культивирования клеток; при этом антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 18С5.

[0026] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело, включающий в себя:

- (а) введение вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела и маркер селекции, в клетки;
- (b) размножение клеток в условиях для осуществления отбора клеток, имеющих увеличенное количество копий вектора;
  - (с) выделение отдельных клеток из отобранных клеток; и
- (d) депонирование клеток, клонированных из одной клетки, отобранной исходя из выхода антитела; при этом антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 18С5.

[0027] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя размножение клеток в условиях отбора, и скрининг на клеточные линии, естественно экспрессирующие и секретирующие по меньшей мере  $100 \text{ мг/л}/10^6 \text{ клеток/24 ч}$ .

[0028] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ ингибирования или уменьшения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.

[0029] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по

эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител, тем самым ингибируя или уменьшая формирование фибрилл транстиретина у субъекта.

[0030] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ уменьшения отложений и агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретинопосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител, тем самым уменьшая отложения транстиретина у субъекта.

[0031] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ удаления транстиретинового амилоида у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител, тем самым удаляя транстиретиновый амилоид из субъекта, относительно субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, который не получает антитело.

[0032] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител.

[0033] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ задержки начала проявления транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме любого из вышеупомянутых новых антител.

[0034] В некоторых таких способах, транстиретин-опосредованный амилоидоз связан с патологией, выбранной из любого из: кардиомиопатии или гипертрофии, наследственной амилоидной полинейропатии, селективного амилоидоза центральной нервной системы (АЦНС), старческого системного амилоидоза, старческого сердечного амилоидоза, стеноза позвоночника, остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, возрастной макулярной дегенерации, и нарушения связок или сухожилий.

[0035] В некоторых таких способах, согласно данному изобретению предложен способ лечения субъекта, имеющего или имеющего риск кардиомиопатии или гипертрофии, наследственной амилоидной полинейропатии, селективного амилоидоза центральной нервной системы (АЦНС), старческого системного амилоидоза, старческого сердечного амилоидоза, стеноза позвоночника, остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, возрастной макулярной дегенерации, и нарушения связок или сухожилий, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме анититела из любого вышеупомянутого нового антитела.

[0036] В некоторых таких способах, антитело вводят в комбинации с вторым антителом, которое связывается с эпитопом TTP, отличающимся от того, с которым связывается 18С5. В некоторых таких способах, второе антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или его химерную или гуманизированную форму. В некоторых таких способах, второе антитело 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 TTP.

[0037] В другом аспекте, антитело вводят в виде монотерапии.

[0038] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ диагностики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта с эффективным количеством любого из вышеупомянутых новых антител. Некоторые такие способы дополнительно включают в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта с эффективным количеством второго антитела, которое связывается с эпитопом ТТР, отличающимся от того, с которым связывается 18С5. В некоторых таких способах, второе 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 химерную или гуманизированную форму. В некоторых таких способах, второе антитело 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 TTP.

[0039] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя обнаружение связывания антитела с транстиретином, при этом присутствие связанного антитела указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.

[0040] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение связывания антитела с биологическим образцом, с связыванием антитела с контрольным образцом, в результате чего увеличенное связывание антитела с биологическим образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.

[0041] В некоторых таких способах, биологический образец и контрольный образец содержат клетки одного и того же тканевого происхождения. В некоторых таких способах, биологический образец и/или контрольный образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань. В некоторых таких способах, твердые ткани берут из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз, брюшного жира, или желудочно-кишечного тракта.

[0042] В некоторых таких способах, транстиретин-опосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретиновый амилоидоз или спорадический В транстиретиновый амилоидоз. некоторых таких способах, наследственный представляет собой наследственную транстиретиновый амилоидоз амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС). В некоторых таких способах, спорадический транстиретиновый амилоидоз представляет собой старческий системный амилоидоз (ССА) или старческий сердечный амилоидоз (ССерА).

[0043] В некоторых таких способах, транстиретин-опосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах, брюшном жире или желудочно-кишечном тракте субъекта.

[0044] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ обнаружения наличия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта, предположительно содержащего скопление амилоида, с эффективным количеством любого из вышеупомянутых новых антител.

[0045] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстиретина.

[0046] Некоторые такие способы дополнительно включают в себя сравнение связывания антитела с биологическим образцом, с связыванием антитела с контрольным образцом, в

результате чего увеличенное связывание антитела с биологическим образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.

[0047] В некоторых таких способах, биологический образец и контрольный образец содержат клетки одного и того же тканевого происхождения. В некоторых таких способах, биологический образец и/или контрольный образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань. В некоторых таких способах, твердые ткани берут из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз, брюшного жира, или желудочно-кишечного тракта.

[0048] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ определения уровня отложений транстиретина у субъекта, включающий в себя введение любого из вышеупомянутых антител и обнаружение присутствия связавшегося антитела у субъекта. В некоторых таких способах, присутствие связанного антитела определяют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

[0049] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение по эффективной схеме стабилизатора тетрамера ТТР, терапевтического агента на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтического РНК-интерференции (РНКи) агента на основе или доксициклина И тауроурсодезоксихолевой кислоты, при этом субъекта до этого лечили любим из вышеперечисленных антител. В некоторых таких способах, субъект больше не получает лечение антителом. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР собой тафамид или 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.

[0050] В некоторых способах, антитело вводят в комбинации с стабилизатором тетрамера ТТР, терапевтическим агентом на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтическим агентом на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой. В некоторых таких способах, стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамид или 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.

[0051] В некоторых способах, антитело вводят в одновременно с стабилизатором тетрамера ТТР, терапевтическим агентом на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтическим агентом на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой. 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.

[0052] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ идентификации антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, включающий в себя: (а) иммунизацию животного ТТР или его фрагментом; и (b) скрининг индуцированных антител для выявления связывания антител в пределах остатков 101-109 ТТР. В некоторых способах, иммунизацию выполняют фрагментом из не больше чем 25 смежных остатков ТТР, включая по меньшей мере 3 смежных остатка в пределах остатков 101-109 ТТР. В некоторых способах, фрагмент состоит из остатков 101-109 ТТР, необязательно соединенных с носителем. В некоторых способах скрининг проводят путем определения связывания антител с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109 ТТР.

[0053] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ идентификации антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, включающий в себя: обеспечение дисплей-библиотеки антител; и скрининг дисплей-библиотеки для идентификации связывания антитела в пределах остатков 101-109 ТТР. В некоторых способах, дисплей-библиотека представляет антитела в виде фрагментов Fv. В некоторых способах, дисплей-библиотека представляет собой наивную дисплей-библиотеку. В некоторых способах, дисплей-библиотеку получают путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор. В некоторых способах, скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109. В некоторых способах, скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с тТР в присутствии контрольного антитела,

которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP. В некоторых способах, контрольное антитело представляет собой 18C5.

[0054] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ идентификации антитела, которое конкурирует за связывание с антителом 18С5 за связывание с ТТР, включающий в себя приведение в контакт ТТР с антителом в присутствии и отсутствии антитела 18С5, и определение связывания антитела с ТТР, причем уменьшенное связывание в присутствии антитела 18С5 указывает на то, что антитело конкурирует с антителом 18С5 за связывание с ТТР.

[0055] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ идентификации антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело 18С5 на TTP, включающий в себя: (а) определение эпитопа, связанного антителом 18С5 на TTP; (b) иммунизацию животного TTP или его фрагментом; и (c) скрининг индуцированных антител для выявления связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18С5. В некоторых способах, эпитоп, связанного антителом 18С5 на TTP, определяют мутагенезом TTP. В некоторых способах, эпитоп, связанного антителом 18С5 на TTP, определяют с помощью рентгеновской кристаллографии.

[0056] B другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ идентификации антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело 18С5 на ТТР, включающий в себя: (а) определение эпитопа, связанного антителом 18С5 на ТТР; (b) обеспечение дисплей-библиотеки антител; и (c) скрининг дисплей-библиотеки для выявления связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18С5. В некоторых способах, эпитоп, связанного антителом 18С5 на ТТР, определяют мутагенезом ТТР. В некоторых способах, эпитоп, связанного антителом 18С5 на ТТР, определяют с помощью рентгеновской кристаллографии. В некоторых способах, дисплей-библиотека предоставляет антитела в виде фрагментов Fv. В некоторых способах, дисплейбиблиотека представляет собой наивную дисплей-библиотеку. В некоторых способах, дисплей-библиотеку получают путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор. В некоторых способах, скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109. В некоторых способах, скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с ТТР в присутствии контрольного антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР. В некоторых способах, контрольное антитело представляет собой 18С5. В некоторых способах, каждый член дисплей-библиотеки экспонирует одну и ту же вариабельную область легкой цепи и отличающуюся вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых способах, вариабельная область легкой цепи представляет собой вариабельную область легкой цепи антитела 18С5. В некоторых способах, вариабельную область тяжелой цепи получают из библиотеки перестроенных вариабельных областей тяжелой цепи человека. В некоторых способах, каждый член дисплей-библиотеки экспонирует одну и ту же вариабельную область тяжелой цепи и отличающуюся вариабельную область легкой цепи. В некоторых способах, вариабельная область тяжелой цепи представляет собой вариабельную область тяжелой цепи антитела 18С5. В некоторых способах, вариабельную область легкой цепи получают из библиотеки перестроенных вариабельных областей легкой цепи человека.

[0057] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен способ лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение иммуногена, содержащего пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот ТТР, с которым специфически связывается антитело 18С5, при этом пептид отдельно и/или когда он связан с гетерологичным носителем, индуцирует формирование антител, специфически связывающихся с ТТР у субъекта.

[0058] В некоторых способах, иммуноген содержит эпитоп, с которым специфически связывается антитело 18С5. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот из остатков 89-127 ТТР. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 11 смежных аминокислот из остатков 100-110 ТТР. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 9 смежных аминокислот из остатков 101-109 ТТР.

[0059] В некоторых способах, пептидный эпитоп ТТР состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 89-127 ТТР. В некоторых способах, пептидный эпитоп ТТР состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 100-110 ТТР. В некоторых способах, пептидный эпитоп ТТР состоит из 4-9 смежных аминокислот из остатков 101-109 ТТР.

[0060] В другом аспекте, согласно данному изобретению предложен иммуноген, содержащий пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот из остатков 89-127 ТТР, соединенных с гетерологичным носителем, который помогает выработке антител против пептида ТТР.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0061] Фиг. 1 иллюстрирует результаты эксперимента с использованием вестернблоттинга, показывающие, что 18С5 обладает высокой реакционной способностью в отношении денатурированного мономера TTP, незначительной реакционной способностью в отношении денатурированного димера, и очень слабой реакционной способностью в отношении нативных частиц TTP.

[0062] Фиг. 2 иллюстрирует результаты эксперимента с использованием вестерн-блоттинга, показывающие, что коммерческое антитело TTP не может различить нативный и денатурированный TTP, и продемонстрирует очень высокую реакционную способность в отношении мономерного, а также димерного нативного и денатурированного TTP.

[0063] Фиг. 3 иллюстрирует выравнивание вариабельных областей тяжелой цепи мышиного 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 нумерация Кабата/Чотиа, выделены жирным шрифтом в последовательности вариабельной области тяжелой цепи 18C5 мыши.

[0064] Фиг. 4 иллюстрирует выравнивание вариабельных областей легкой цепи мышиного 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 системе нумерации Кабата/Чотиа, выделены жирным шрифтом в последовательности вариабельной области легкой цепи 18C5 мыши.

# КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0065] SEQ ID NO: 1 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0066] SEQ ID NO: 2 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0067] SEQ ID NO: 3 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи антитела 18C5 мыши с сигнальным пептидом.

[0068] SEQ ID NO: 4 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела 18С5 мыши с сигнальным пептидом.

[0069] SEQ ID NO: 5 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0070] SEQ ID NO: 6 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-Н1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0071] SEQ ID NO: 7 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0072] SEQ ID NO: 8 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-Н2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0073] SEQ ID NO: 9 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0074] SEQ ID NO: 10 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-H3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0075] SEQ ID NO: 11 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0076] SEQ ID NO: 12 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L1 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0077] SEQ ID NO: 13 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0078] SEQ ID NO: 14 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L2 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0079] SEQ ID NO: 15 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0080] SEQ ID NO: 16 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR-L3 антитела 18C5 мыши согласно совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа.

[0081] SEQ ID NO: 17 представляет аминокислотную последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18С5 (IgG1 человека).

[0082] SEQ ID NO: 18 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18С5 (IgG1 человека).

[0083] SEQ ID NO: 19 представляет аминокислотную последовательность химерной константной области легкой цепи 18С5 (каппа человека).

[0084] SEQ ID NO: 20 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность химерной константной области легкой цепи 18С5 (каппа человека).

[0085] SEQ ID NO: 21 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1.

[0086] SEQ ID NO: 22 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0087] SEQ ID NO: 23 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0088] SEQ ID NO: 24 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи с N-концевым аргинином.

[0089] SEQ ID NO: 25 представляет аминокислотную последовательность иллюстративной константной области легкой цепи без N-концевого аргинина.

[0090] SEQ ID NO: 26 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа P02766.1 (UniProt).

[0091] SEQ ID NO: 27 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа AAB35639.1 (GenBank).

[0092] SEQ ID NO: 28 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную под номером доступа AAB35640.1 (GenBank).

[0093] SEQ ID NO: 29 представляет аминокислотную последовательность транстиретина человека, представленную по номером доступа ABI63351.1 (GenBank).

[0094] SEQ ID NO: 30 представляет аминокислотную последовательность остатков 101-109 транстиретина человека.

[0095] SEQ ID NO: 31 представляет аминокислотную последовательность остатков 87-127 транстиретина человека.

[0096] SEQ ID NO: 32 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область тяжелой цепи G1m3 IgG1.

[0097] SEQ ID NO: 33 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область легкой цепи с С-концевым аргинином.

[0098] SEQ ID NO: 34 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративную константную область легкой цепи без С-концевого аргинина.

[0099] SEQ ID NO: 35 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида константной области тяжелой цепи.

[0100] SEQ ID NO: 36 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид константной области тяжелой цепи.

[0101] SEQ ID NO: 37 представляет аминокислотную последовательность сигнального пептида константной области легкой цепи.

[0102] SEQ ID NO: 38 представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид константной области легкой цепи.

[0103] SEQ ID NO: 39 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 14G8.

[0104] SEQ ID NO: 40 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 14G8.

- [0105] SEQ ID NO: 41 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 14G8.
- [0106] SEQ ID NO: 42 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 14G8.
- [0107] SEQ ID NO: 43 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 14G8.
- [0108] SEQ ID NO: 44 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 14G8.
- [0109] SEQ ID NO: 45 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антитела 5A1.
- [0110] SEQ ID NO: 46 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 5A1.
- [0111] SEQ ID NO: 47 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 5A1.
- [0112] SEQ ID NO: 48 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 5A1.
- [0113] SEQ ID NO: 49 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 5A1.
- [0114] SEQ ID NO: 50 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 5A1.
- [0115] SEQ ID NO: 51 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 5A1.
- [0116] SEQ ID NO: 52 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 6С1.
- [0117] SEQ ID NO: 53 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 6С1.

- [0118] SEQ ID NO: 54 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 6C1.
- [0119] SEQ ID NO: 55 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 6C1.
- [0120] SEQ ID NO: 56 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 6С1.
- [0121] SEQ ID NO: 57 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 6C1.
- [0122] SEQ ID NO: 58 представляет аминокислотную последовательность области VH антитела AD7F6.
- [0123] SEQ ID NO: 59 представляет аминокислотную последовательность области VL антитела AD7F6.
- [0124] SEQ ID NO: 60 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела RT24.
- [0125] SEQ ID NO: 61 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела RT24.
- [0126] SEQ ID NO: 62 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела RT24.
- [0127] SEQ ID NO: 63 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела RT24.
- [0128] SEQ ID NO: 64 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела RT24.
- [0129] SEQ ID NO: 65 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела RT24.
- [0130] SEQ ID NO: 66 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 антитела NI-301.35G11.

[0131] SEQ ID NO: 67 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 антитела NI-301.35G11.

[0132] SEQ ID NO: 68 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 антитела NI-301.35G11.

[0133] SEQ ID NO: 69 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 антитела NI-301.35G11.

[0134] SEQ ID NO: 70 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 антитела NI-301.35G11.

[0135] SEQ ID NO: 71 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 антитела NI-301.35G11.

[0136] SEQ ID NO: 72 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антител MFD101, MDF102, MFD103, MFD105.

[0137] SEQ ID NO: 73 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антител MFD107, MFD108, MFD109, MFD111.

[0138] SEQ ID NO: 74 представляет аминокислотную последовательность эпитопа антитела MFD114.

[0139] SEQ ID NO: 75 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 9D5.

[0140] SEQ ID NO: 76 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Кабату антитела 9D5.

[0141] SEQ ID NO: 77 представляет аминокислотную последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 9D5.

[0142] SEQ ID NO: 78 представляет аминокислотную последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 9D5.

[0143] SEQ ID NO: 79 представляет аминокислотную последовательность CDR-L2 по Кабату антитела 9D5.

- [0144] SEQ ID NO: 80 представляет аминокислотную последовательность CDR-L3 по Кабату антитела 9D5.
- [0145] SEQ ID NO: 81 представляет аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи антитела 18С5 мыши.
- [0146] SEQ ID NO: 82 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела Fab антипироглутамат-Абета с №17 мыши, номер доступа GenBank № 1212215935.
- [0147] SEQ ID NO: 83 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного Crenezumab Fab (CreneFab) PDB: 5VZY, номер доступа GenBank № 1229749875.
- [0148] SEQ ID NO: 84 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи последовательности IGHV3-48\*01 зародышевой линии человека, номер доступа GenBank № 1FN550289.1.
- [0149] SEQ ID NO: 85 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18C5 гум18C5-VH 1.
- [0150] SEQ ID NO: 86 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18C5 гум18C5-VH 2.
- [0151] SEQ ID NO: 87 представляет аминокислотную последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи антитела 18С5 мыши.
- [0152] SEQ ID NO: 88 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи антитела Fab антипироглутамат-Абета с №17 мыши, номер доступа GenBank № 1212215934.
- [0153] SEQ ID NO: 89 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного Crenezumab Fab (CreneFab) PDB: 5VZY, номер доступа GenBank № 1229749876.
- [0154] SEQ ID NO: 90 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи последовательности зародышевой линии IGKV2-30\*2 человека, номер доступа GenBank № CAA77315.

- [0155] SEQ ID NO: 91 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 гум18C5-VL 1.
- [0156] SEQ ID NO: 92 представляет аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 гум18C5-VL 2.
- [0157] SEQ ID NO: 93 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Кабату антитела 18C5 мыши.
- [0158] SEQ ID NO: 94 представляет аминокислотную последовательность CDR-H1 по Чотиа антитела 18C5 мыши.
- [0159] SEQ ID NO: 95 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-Н1 антитела 18C5 мыши.
- [0160] SEQ ID NO: 96 представляет аминокислотную последовательность CDR-H2 по Чотиа антитела 18C5 мыши.
- [0161] SEQ ID NO: 97 представляет аминокислотную последовательность AтM CDR-H2 антитела 18C5 мыши.
- [0162] SEQ ID NO: 98 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-Н2 антитела 18C5 мыши.
- [0163] SEQ ID NO: 99 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-Н3 антитела 18C5 мыши.
- [0164] SEQ ID NO: 100 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L1 антитела 18C5 мыши.
- [0165] SEQ ID NO: 101 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L2 антитела 18C5 мыши.
- [0166] SEQ ID NO: 102 представляет аминокислотную последовательность контакта CDR-L3 антитела 18C5 мыши.

### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0167] 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

ненужных 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.

[0168] Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном означает аффинность, которая составляет по меньшей мере 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, или 10<sup>10</sup> М<sup>-1</sup>. 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.

[0169] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область длинной примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в основном отвечающих за распознавание антигена. Данная вариабельная область в первоначальном экспрессированном виде связана с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельная область без сигнального пептида иногда упоминается как зрелая вариабельная область. Так, например, зрелая вариабельная область легкой цепи обозначает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом отвечающую за эффекторную функцию.

[0170] Легкие цепи делят на каппа и лямбда. Тяжелые цепи разделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и выделяют такие изотипы антитела как: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельная и константная

области соединяются областью «Ј», длинной 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).

[0171] Вариабельная область легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (также называемая в данном документе «вариабельный домен легкой цепи» («домен VL») или «вариабельный домен тяжелой цепи» («домен VH»), соответственно) состоит из «каркасной» области, прерывающейся тремя «областями, определяющими комплементарность» или «CDR». Каркасные области используют для выравнивания CDR по специфическому связыванию с эпитопом антигена. CDR содержат аминокислотные остатки антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От аминоконца до карбоксиконца 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.

[0172] 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 and 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 CDR Чотиа и Кабату; определение AтM, 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	Чотиа	Совмещенная система по Чотиа и по Кабату	АтМ	Контакт
L1	L24L34	L24L34	L24L34	L24L34	L30L36
L2	L50L56	L50L56	L50L56	L50L56	L46L55
L3	L89L97	L89L97	L89L97	L89L97	L89L96
H1	Н31Н35В	H26H32H34*	H26H35B*	H26H35B	Н30Н35В
H2	H50H65	H52H56	H50H65	H50H58	H47H58
Н3	H95H102	H95H102	H95H102	H95H102	H93H101

\*СDR-Н1 по Чотиа может заканчиваться на Н32, Н33 или Н34 (в зависимости от длины петли). Это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату размещают вставки дополнительных остатков в 35A и 35B, тогда как в нумерации по Чотиа их размещают в 31A и 31B. Если не представлено ни Н35A, ни Н35B (нумерация по Кабату), петля CDR-Н1 по Чотиа заканчивается на Н32. Если есть только Н35A, она заканчивается на Н33. Если присутствуют и Н35A и Н35B, она заканчивается на Н34.

[0173] Термин «антитело» включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F (ab)c, Dabs, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть

продуцированы с помощью способов рекомбинантной ДНК, или путем ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин «антитело» также включает биспецифическое антитело и/или гуманизированное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей и два разных сайта связывания (смотрите, например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). В некоторых биспецифических антителах две различные пары тяжелых/легких цепей включают пару тяжелая цепь/легкая цепь гуманизированного 18С5 и пару тяжелая цепь/легкая цепь, специфичную к другому эпитопу на транстиретине, чем тот, что связан антителом 18С5.

[0174] В некоторых биспецифических антителах одна пара тяжелая цепь/легкая цепь представляет собой гуманизированное антитело 18С5, 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) 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, 84га43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84га44, 2011).

[0175] Примерами биспецифических антител также могут быть: 1) антитело с двойным вариабельным доменом (DVD-IM), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два вариабельных домена в тандеме посредством короткого пептидного соединения (Wu *et al.*, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) тандаб (Tandab), которое представляет собой гибрид двух одноцепочечных диател, образующих четырехвалентное биспецифическое антитело, которое имеет два сайта связывания для каждого из целевых антигенов; 3) флекситело, которое представляет собой совмещение scFvs с диателом, приводящее к образованию мультивалентной 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 отличающемуся 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).

[0176] 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 в себя, 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 смежные 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 (TTP) (зрелая область SEQ ID NO: 26), например, то подразумевается, что эпитоп находится в пределах описанного промежутка аминокислот, включая те, которые определяют внешние промежутка. Это не обязательно означает, что каждая аминокислота в пределах промежутка составляет часть эпитопа. Так, например, эпитоп в пределах аминокислотных остатков 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 108-109 SEQ ID NO: 26, среди других линейных сегментов SEQ ID NO: 30, или в случае конформационных эпитопов, несмежных сегментов аминокислот SEQ ID NO: 30.

[0177] Антитела, которые распознают одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы обычным иммуноанализом, который демонстрирует 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

[0178] 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.

[0179] 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

TTP могут включать молекулы, содержащие аминокислотные последовательности TTP дикого типа или мутации.

[0180] 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.

[0181] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель, эксципиент или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами состава и не является по существу вредным для его реципиента.

[0182] Термин «пациент» включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0183] Индивид подвержен повышенному риску заболевания, если у субъекта есть по меньшей мере один известный фактор риска (например, генетический, биохимический, семейный анамнез и ситуационный риск), в результате чего индивиды с этим фактором риска имеют статистически значимый больший риск развития заболевания чем индивиды без фактора риска.

[0184] 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.

[0185] 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 содержит TTP. образцом, который, как считается, амилоидные отложения Предпочтительно ткань в контрольном образце имеет тот же самый тип, что и ткань в биологическом образце (например, кардиомиоциты в сердце).

[0186] 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.

[0187] Термин «симптом» относится к субъективным свидетельствам заболевания, таким как измененная походка, как это воспринимается субъектом. «Признак» относится к объективным свидетельствам болезни, наблюдаемым врачом.

[0188] Для классификации консервативные аминокислотных замен на или неконсервативные, аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа І (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены подразумевают замены между аминокислотами в одном классе. Неконсервативные замены заключаются в обмене члена одного из этих классов на член другого.

[0189] 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.

[0190] 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.

[0191] Обозначение диапазона значений включает все целые числа в пределах диапазона или задающие диапазон, и все поддиапазоны, заданные целыми числами в пределах диапазона.

[0192] Если иное не вытекает из контекста, термин «около» охватывает значения в пределах стандартной погрешности измерения (например, SEM) указанного значения.

[0193] Статистическая значимость означает  $p \le 0.05$ .

[0194] 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.

[0195] Лечение является симптоматическим, если оно затрагивает только один или несколько симптомов заболевания, а не его причину, то есть его этиологию.

[0196] Формы существительных в единственном числе включат 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.

Если иное не очевидно из контекста, когда описание патента раскрывает то, что продукт или способ содержит определенный признак или комбинацию признаков, описание патента следует понимать как альтернативно раскрывающий продукт или способ, состоящий или состоящий по существу из признака или комбинации признаков.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Общие положения

[0197] Согласно данному изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с остатками 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 18С5, не обладает специфическим связыванием с нативной тетрамерной формой ТТР.

## II. Целевые молекулы

[0198] Транстиретин (ТТР) представляет собой сывороточный белок и транспортный белок спинномозговой жидкости, имеет длину 127 аминокислот, массу 55 кДа, и синтезируется в основном печенью. Он также упоминается как преальбумин, тироксинсвязывающий преальбумин, 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.

[0199] Установленная функция ТТР в крови заключается в транспорте holo- ретинолсвязывающего белка. Хотя ТТР является основным переносчиком тироксина ( $T_4$ ) в крови грызунов, задействуя сайты связывания, которые ортогональны к сайтам, используемым для holo-ретинолсвязывающего белка, сайты связывания  $T_4$  фактически незаняты у людей.

[0200] ТТР является одним из по меньшей мере тридцати различных человеческих белков, чье внеклеточное неправильное свертывание и/или неправильная сборка (амилоидогенез) в многообразие агрегатных структур, как полагают, 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 беталистами.

[0201] Если иное не очевидно из контекста, отсылка к транстиретину (ТТР) или его фрагментам В себя природные или доменам включает аминокислотные последовательности человека, включая их изоформы, мутантные, 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 Р02766.1 при максимальном выравнивании.

## III. Транстиретиновый амилоидоз

[0202] 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 TTP (из-за условий среды или генетических патологий), что приводит к диссоциации, неправильному свертыванию и агрегации TTP 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).

[0203] У людей, как тетрамеры ТТР дикого типа, так и смешанные тетрамеры, состоящие из субъединиц мутантного и дикого типа, могут диссоциировать, неправильно свертыватся 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.

[0204] Например, амилоидоз ATTP дикого типа (также называемый старческим системным амилоидозом или CCA) и старческий сердечный амилоидоз (ССерА) представляют собой возрастные типы амилоидоза, которые возникают в результате отложения TTP амилоида дикого типа за пределами и внутри кардиомиоцитов сердца. TTP амилоидоз также является наиболее распространенной формой наследственного (семейного) амилоидоза, который вызван мутациями, которые дестабилизируют белок TTP. TTP амилоидозы, связанные с точечными мутациями в гене TTP, включают наследственную амилоидную полиневропатию (НАП), наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК) и редкий избирательный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС). Пациенты с наследственным (семейным) TTP амилоидозом по существу всегда являются гетерозиготами, что означает, что тетрамеры TTP состоят из субъединиц TTP мутантного и/или дикого типа, в целом, как правило, статистически распределены. Наследственные (семейные) формы амилоидоза TTP, как правило, являются аутосомнодоминантными и, как правило, имеют более раннее проявление первых симптомов, чем спорадические заболевания (ССА и СсерА).

[0205] В гене, кодирующем ТТР, более 100 мутаций которые связывают с аутосомнодоминантными 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 TTP в целом, как правило, определяется комбинацией его нестабильности и эффективности его клеточной секреции. Первоначальная патология, вызванная некоторыми вариантами TTP, является результатом их избирательного разрушения сердечной ткани, тогда как другие варианты TTP приводят к нарушениям в периферической и вегетативной нервной системах. Повреждение ткани, вызванное TTP амилоидогенезом, по-видимому, обусловлено главным образом токсичностью небольших, диффундирующих агрегатов TTP, хотя накопление внеклеточного амилоида может способствовать и по существу наверняка приводит к изменению структуры органа на поздних стадиях амилоидоза TTP.

[0206] 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.

[0207] 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 нейропатического заболевания, особенно связанного 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 характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атрио-вентрикуляный 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 в себя, например, полинейропатию, потерю чувствительности, боль, слабость нижних конечностей, дисгидроз, диарею, запор, потерю веса и недержание/удержание мочи.

[0208] Диагностика амилоидоза ТТР обычно основывается на биопсии органов-мишеней с гистологическим окрашиванием вырезанной ткани последующим помощью специфического красителя «конго красный». Если наблюдается К амилоиду положительный результат на амилоид, впоследствии проводится иммуногистохимическое окрашивание 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 неамилоидоза ТТР, например, амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ), также известного как первичный системный амилоидоз. Для наследственных форм заболевания, затем необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем ТТР, до того, как будет поставлен диагноз. Это можно достигнуть, например, посредством изоэлектрического электрофореза, полимеразной цепной фокусирующего реакции 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

### А. Специфичность связывания и функциональные свойства

[0209] Согласно изобретению предложены моноклональные антитела, связывающиеся с белком транстиретином (TTP), более конкретно, с эпитопами в пределах аминокислотных остатков 101-109 (SEQ ID NO: 30) TTP. Такие эпитопы являются скрытыми в нативном тетрамере TTP и экспонированы в мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных формах TTP.

[0210] Одно такое антитело представляет собой 18С5, и его химерные венированные и гуманизированные формы. Антитело специфически связывается с аминокислотными остатками 101-109 (SEQ ID NO: 30) TTP. Это антитело дополнительно характеризуется способностью его связываться c 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 использованием иллюстративных форматов cанализов, представленных в примерах. Если иное не очевидно из контекста, ссылка на 18С5 должна пониматься как ссылка на любую из мышиных, химерных, венированных или Линия гибридомных гуманизированных форм. клеток, которая продуцирует 18C5, моноклональное антитело была депонирована В Патентном хранилище

Американской коллекции типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, 20110-2209, 31 октября 2017 года, и ей было присвоено патентное депонирование № PTA-124570.

[0211] Некоторые антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом что и антитело, обозначенное как 18С5. Последовательности зрелых вариабельных 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 с TTP, или его частью, включая желаемый эпитоп (например, SEQ ID NO: 30), и скрининга полученных антител на связывание с мономерным TTP или пептидом, содержащим SEQ ID NO: 30, необязательно в конкуренции с антителом, имеющим вариабельные области 18C5 мыши (IgG1, каппа). Фрагменты TTP, включая желаемый эпитоп, могут быть связаны с носителем, который помогает вызвать ответ антитела на фрагмент, и/или могут быть объединены с адъювантом, 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.

[0212] Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного антитела мыши (например, 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 TTP или его фрагмента (например, 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 экспонирует одинаковую вариабельную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплей-библиотеки), и отличающуюся 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 TTP или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 101-109). Полученные антитела обычно имеют такую же или сходную специфичность к эпитопу, что и исходный материал мыши.

[0213] Другие антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как 18С5. В изобретение также включены моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% идентичны 18C5 или антителу ПО аминокислотной последовательности вариабельных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепи, и сохраняют функциональные свойства, и/или которые его отличаются 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 18C5.

[0214] В данном изобретении также предложены антитела, имеющие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR полностью или практически полностью 18С5. 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 18С5, и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере две и, как правило, все три CDR полностью или по существу полностью из вариабельной области легкой цепи 18С5. Антитела могут также содержать как тяжелые, так и легкие цепи. CDR является по существу полностью взят из соответствующего CDR 18С5, когда он содержит не больше чем 4, 3, 2 или 1 замен, вставок или делеций, за

исключением того, что CDR-H2 (когда определено по Кабату) может иметь не больше чем 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены, вставки или удаления. Такие антитела могут иметь по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с 18С5 по аминокислотной последовательности вариабельных областей зрелой тяжелой и/или легкой цепей, и сохраняют его функциональные свойства, и/или которые отличаются от 18С5 небольшим числом функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок.

[0215] CDR по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) тяжелой цепи 18C5 обозначены как SEQ ID NO: 5, 7 и 9, соответственно, и CDR по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) легкой цепи 18C5 обозначены как SEQ ID NO: 11, 13 и 15, соответственно.

[0216] В Таблице 2 указаны CDR 18C5, как определено по Кабату, Чотиа, совмещенной (нумерации) по Кабату и Чотиа (также называемый в данном документе «по совмещенной Кабату/Чотиа»), АтМ и определению контакта.

Таблица 2 CDR 18C5, как определено по Кабату, Чотиа, совмещенной по Кабату и Чотиа, АтМ, и определению контакта, используя нумерацию Кабата

Петля	по Кабату	Чотиа	Совмещенная по Чотиа и Кабату	АтМ	Контакт
L1	L24L34 SEQ ID NO: 11	L24L34 SEQ ID NO: 11	L24L34 SEQ ID NO: 11	L24L34 SEQ ID NO: 11	L30L36 SEQ ID NO: 100
L2	L50L56 SEQ ID NO: 13	L50L56 SEQ ID NO: 13	L50L56 SEQ ID NO: 13	L50L56 SEQ ID NO: 13	L46L55 SEQ ID NO: 101
L3	L89L97 SEQ ID NO: 15	L89L97 SEQ ID NO: 15	L89L97 SEQ ID NO: 15	L89L97 SEQ ID NO: 15	L89L96 SEQ ID NO: 102
H1	H31H35B SEQ ID NO: 93	H26H32 SEQ ID NO: 94	H26H35B SEQ ID NO: 5	H26H35B SEQ ID NO: 5	H30H35B SEQ ID NO: 95
H2	H50H65 SEQ ID NO: 7	H52H56 SEQ ID NO: 96	H50H65 SEQ ID NO: 7	H50H58 SEQ ID NO: 97	H47H58 SEQ ID NO: 98
Н3	H95H102 SEQ ID NO: 9	H95H102 SEQ ID NO: 9	H95H102 SEQ ID NO: 9	H95H102 SEQ ID NO: 9	H93H101 SEQ ID NO: 99

[0217] Некоторые антитела, идентифицированные с помощью таких анализов, могут связываться мономерными, неправильно агрегированными cсвернутыми, фибрильными формами ТТР, но не с нативной тетрамерной формой ТТР, как описано в примерах где-либо или еще. Аналогично, некоторые антитела являются иммунореактивными к ткани, подверженной TTP-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой ткани.

[0218] 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 продемонстрировано 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); and Santos *et al.*, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010).

[0219] Антитело, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, можно идентифицировать путем иммунизации животного ТТР или его фрагментом, и скрининга индуцированных антител для идентификации связывания антитела в пределах остатков 101-109 ТТР. Животное может представлять собой, например, грызуна, такого как мышь, кролик или крыса. Животное может быть трансгенным, таким как грызун, модифицированный, чтобы иметь гены иммуноглобулина человека. Фрагмент, используемый для иммунизации, может представлять собой фрагмент не больше чем из 25 смежных остатков ТТР, включая, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 смежных остатков в пределах остатков 101-109 ТТР. Фрагмент, используемый для иммунизации, может состоять из остатков 101-109 ТТР. Фрагмент, используемый для иммунизации, может быть соединен с носителем, чтобы помочь вызвать выработку антител. Антитело может быть подвергнуто скринингу путем определения, связывается ли антитело с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109. Необязательно, антитело также может быть подвергнуто скринингу на связывание с полноразмерным ТТР.

[0220] Антитело, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, можно идентифицировать, предоставляя дисплей-библиотеку для антител и выполняя скрининг дисплей-библиотеки для идентификации связывания антитела в пределах остатков 101-109 ТТР. Дисплей-библиотека может представлять собой библиотеку фагового дисплея, библиотеку дрожжевого дисплея, библиотеку рибосомного дисплея, и

другие. Дисплей-библиотека может, например, экспонировать антитела в виде фрагментов Fv или Fab. Дисплей-библиотека может быть наивной дисплей-библиотекой. Способы выделения антител из библиотек фагового дисплея раскрыты, например, в WO 2017/207739. В альтернативном варианте, дисплей-библиотека может быть получена путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор. Грызуном может быть, например, мышь, кролик или крыса. Фрагмент, используемый для иммунизации, может представлять собой фрагмент не больше чем из 25 смежных остатков ТТР, включая, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 смежных остатков в пределах остатков 101-109 ТТР. Фрагмент, используемый для иммунизации, может состоять из остатков 101-109 ТТР. Фрагмент, используемый для иммунизации, может быть соединен с носителем, чтобы помочь вызвать выработку антител. Члены библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на связывание с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109. Необязательно, члены библиотеки также могут быть подвергнуты скринингу на связывание полноразмерного ТТР. Члены библиотеки могут быть подвергнуты скринингу в присутствии контрольного антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP. Контрольное антитело может представлять собой антитело 18C5.

[0221] Исследуемое антитело, которое конкурирует за связывание с антителом 18С5 за связывание с ТТР, может быть идентифицировано путем приведения в контакт ТТР с исследуемым антителом в присутствии и отсутствии антитела 18С5, и определения связывания антитела с ТТР. Уменьшение связывания антитела в присутствии антитела 18С5 указывает на то, что антитело конкурирует с антителом 18С5 за связывание с ТТР. В альтернативном варианте или дополнительно, анализ может быть выполнен путем приведения в контакт ТТР с антителом 18С5 в присутствии или отсутствие исследуемого антитела, и в этом случае уменьшенное связывание 18С5 с ТТР в присутствии исследуемого антитела указывает на конкуренцию.

[0222] Антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело 18С5 на ТТР, можно идентифицировать путем определения эпитопа, связанного антителом 18С5 на ТТР, иммунизации животного ТТР или его фрагментом, и скрининга индуцированных антител для идентификации связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18С5. Животное может представлять собой, например, грызуна, такого как мышь, кролик или крыса. Животное может быть трансгенным, таким как грызун, модифицированный, чтобы иметь гены иммуноглобулина человека.

[0223] Антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело 18С5 на ТТР, можно идентифицировать путем определения эпитопа, связанного антителом 18С5 на ТТР, предоставляя дисплей-библиотеку для экспонирования и скрининга дисплей-библиотеки для идентификации связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18С5. Дисплей-библиотека может представлять собой библиотеку фагового дисплея, дрожжевого дисплея или рибосомного дисплея. Дисплей-библиотека может, например, предоставлять антитела в виде фрагментов Fv или фрагментов Fab. Дисплей-библиотека может быть наивной дисплей-библиотекой. Способы выделения антител из библиотек фагового дисплея раскрыты, например, в WO 2017/207739.

[0224] Антитела также могут быть получены способом фагового дисплея, чтобы иметь специфичность связывания выбранного мышиного антитела (например, 18С5). 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 108, а предпочтительно по меньшей мере  $10^9~{
m M}^{-1}$ ) для мономера TTP или его фрагмента (например, 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 экспонирует одинаковую вариабельную область тяжелой цепи (то есть область, идентифицированную из первой дисплейбиблиотеки), и отличающуюся вариабельную область легкой цепи. Вариабельные области легкой цепи могут быть получены, например, из библиотеки перегруппированных вариабельных областей легкой цепи человека. Опять же, выбирают демонстрирующий сильное специфическое связывание для мономерного ТТР или его фрагмента (например, аминокислотных остатков 101-109). Полученные антитела обычно имеют такую же или сходную специфичность к эпитопу, что и исходный материал мыши.

[0225] Дисплей-библиотека для продуцирования антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело 18С5 на ТТР, может быть получена путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор. Грызуном может быть, например, мышь, кролик

или крыса. Фрагмент, используемый для иммунизации, может представлять собой фрагмент не больше чем из 25 смежных остатков TTP, включая, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 смежных остатков в пределах остатков 101-109 TTP. Фрагмент, используемый для иммунизации, может состоять из остатков 101-109 TTP. Фрагмент, используемый для иммунизации, может быть соединен с носителем, чтобы помочь вызвать выработку антител.

[0226] Члены дисплей-библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на связывание с фрагментом ТТР, состоящим из остатков 101-109. Необязательно, члены библиотеки также могут быть подвергнуты скринингу на связывание полноразмерного ТТР. Члены библиотеки могут быть подвергнуты скринингу в присутствии контрольного антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР. Контрольное антитело может представлять собой антитело 18С5.

[0227] Эпитоп, связанный антителом 18С5 на ТТР, можно определить, например, путем измерения связывания 18С5 с мономерными вариантами ТТР дикого типа или их фрагментами, по сравнению с мутантами по указанным остаткам. 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. 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. Эпитоп, связанный антителом 18С5 на ТТР, также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для идентификации остатков контакта. Два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если они имеют одинаковые контактирующие остатки.

[0228] Анти-ТТР антитела, связывающиеся с эпитопами ТТР, отличающимися от таковых 18С5, включая их химерные и гуманизированные варианты, полезны в комбинированной терапии, в биспецифических антителах, в способах диагностики и/или лечения нарушений, связанных с ТТР, и в способах обнаружения ТТР антителами 18С5 согласно данному изобретению. Такие анти-ТТР антитела, связывающиеся с эпитопами ТТР, отличающимися от таковых 18С5, могут включать в себя антитела, как в Таблице 3 ниже.

[0229] Таблица 3: Анти-ТТР антитела.

Название	ие Эпитоп на TTP как VH/VL или CDR как		Источник
	сообщено	но сообщено	
9D5	EHAEVVFTA (89-97)	CDR по Кабату:	WO 2016/120810
	(SEQ ID NO: 45)	CDR-H1 SEQ ID NO: 75	A1
		CDR-H2 SEQ ID NO: 76	Депозит АКТК №
		CDR-H3 SEQ ID NO: 77	PTA-124078
		CDR-L1 SEQ ID NO: 78	Дата: 4 апреля
		CDR-L2 SEQ ID NO: 79	2017 года
		CDR-L3 SEQ ID NO: 80	
14 <b>G</b> 8	EHAEVVFTA (89-97)	CDR по Кабату	WO 2016/120810
	(SEQ ID NO: 45)	CDR-H1 SEQ ID NO: 39	A1
		CDR-H2 SEQ ID NO: 40	Депозит АКТК №
		CDR-H3 SEQ ID NO: 41	PTA-124079
		CDR-L1 SEQ ID NO: 42	Дата: 4 апреля
		CDR-L2 SEQ ID NO: 43	2017 года
		CDR-L3 SEQ ID NO: 44	
5A1	EHAEVVFTA (89-97)	CDR по Кабату	WO 2016/120811
	(SEQ ID NO: 45)	CDR-H1 SEQ ID NO: 46	Депозит АКТК №
		CDR-H2 SEQ ID NO: 47	PTA-124080
		CDR-H3 SEQ ID NO: 48	Дата: 4 апреля
		CDR-L1 SEQ ID NO: 49	2017 года
		CDR-L2 SEQ ID NO: 50	
		CDR-L3 SEQ ID NO: 51	
6C1	EHAEVVFTA (89-97)	CDR по Кабату	WO 2016/120809
	(SEQ ID NO: 45)	CDR-H1 SEQ ID NO: 52	Депозит АКТК №
		CDR-H2 SEQ ID NO: 53	PTA-124077
		CDR-H3 SEQ ID NO: 54	Дата: 4 апреля
		CDR-L1 SEQ ID NO: 55	2017 года
		CDR-L2 SEQ ID NO: 56	
		CDR-L3 SEQ ID NO: 57	
AD7F6		VH SEQ ID NO: 58	WO 2010/030203
		VL SEQ ID NO: 59	A1
		, L 5L Q ID 110. 57	***

Название	Эпитоп на ТТР как	VH/VL или CDR как	Источник
	сообщено	сообщено	
RT24	118-122, 115-124	CDR-H1 SEQ ID NO: 60	WO 2015/115331
		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	
NI-	53-63, 54-61	CDR-H1 SEQ ID NO: 66	US 2016/0355576
301.35G11		CDR-H2 SEQ ID NO: 67	A1
		CDR-H3 SEQ ID NO: 68	
		CDR-L1 SEQ ID NO: 69	
		CDR-L2 SEQ ID NO: 70	
		CDR-L3 SEQ ID NO: 71	
MFD101,	ADDTWEPFASGKT		US 2016/0039916
MDF102,	(остатки 36-49) (SEQ ID		A1
MFD103,	NO: 72)		
MFD105			
MFD107,	TSESGELHGLTTE		US 2016/0039916
MFD108,	(остатки 49-61) (SEQ ID		A1
MFD109,	NO: 73)		
MFD111			
MFD114	ALLSPYSYSTTAV		US 2016/0039916
	(остатки 109-121) (SEQ		A1
	ID NO: 74)		
	30-66		US 2016/0039916
			A1
	70-127		US 2016/0039916
			A1
	80-127		US 2016/0039916
			A1
	90-127		US 2016/0039916

Название	Эпитоп на ТТР как	VH/VL или CDR как	Источник
	сообщено	сообщено	
			A1
	100-127		US 2016/0039916
			A1
	110-127		US 2016/0039916
			A1
	115-127		US 2016/0039916
			A1

## В. Нечеловеческие антитела

[0230] Производство других нечеловеческих антител, например, антител мыши, морской свинки, примата, кролика или крысы, к мономерному ТТР или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 101-109) может быть осуществлено, например, путем иммунизации животного с помощь TTP 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. иммуноген можно вводить слитым, или иным образом совмещенным с белком-носителем. Необязательно, иммуноген можно вводить с адъювантом. Могут быть использованы несколько типов адъювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адъювант Фрейнда, после которого применяют неполный адъювант. Кролики или морские свинки обычно используются для получения поликлональных антител. Мышей обычно используют для продуцирования моноклональных антител. Антитела скринируют на специфическое связывание с мономерным ТТР или эпитопом в ТТР (например, эпитопом, содержащим один или большее количество аминокислотных остатков 101-109). Такой скрининг может быть осуществлен путем определения связывания антитела с набором мономерных вариантов ТТР, таких как варианты ТТР, 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

[0231] Гуманизированное антитело в собой целом представляет 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 константной области Подобным последовательностей человека. 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% 100% соответствующих остатков, определенных согласно общепринятому или

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 меньшей мере 85% идентичности в зрелых вариабельных областях 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, mAbs 8:1, 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. Bo избежание «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 обеим 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

последовательностями зародышевой линии человека. Некоторые из 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 определение 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 зародышевой линии человека в сочетании с последовательностями 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 18С5, 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, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92.

[0232] 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-тю 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).

[0233] В некоторых антителах, для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не входящие в SDR, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR-H2 часто не требуются), на основании областей CDR по Кабату, расположенных вне гипервариабельных петель по Чотиа (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. В таких гуманизированных антителах в позициях, в которых отсутствует один или 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.

[0234] 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.

[0235] Примером акцепторной последовательности для тяжелой цепи 18C5 является гуманизированная VH Fab кренезумаба (CreneFab) с номером доступа 5VZY в PDB (SEQ ID NO: 83). Примером акцепторной последовательности для легкой цепи 18C5 является гуманизированная VL Fab кренезумаба (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).

[0236] 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.

[0237] 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.

[0238] 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 мышиного антитела, если разумно ожидать, что аминокислота:

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

[0239] Согласно данному изобретению предложены гуманизированные формы антитела 18С5 мыши, включая 2 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области тяжелой цепи (гум18С5-VH\_v1 (SEQ ID NO: 85) и гум18С5-VH\_v2 (SEQ ID NO: 86)), и 2 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области легкой цепи (гум18С5-VL\_v1 (SEQ ID NO: 91) и гум18С5-VL\_v2 (SEQ ID NO: 92)).

[0240] 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)].

[0241] 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 антигенсвязывающей петли и играют определенную роль в тонкой подгонке антитела к антигену, иногда упоминаются как остатки Верьне (Foote & Winter, *J. Mol. Biol* 224:487-499 (1992)).

[0242] 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.

[0243] Другие каркасные остатки, которые являются кандидатами на замещение, представляют собой N-концевые остатки глутаминовой кислоты (E), которые могут быть заменены на глутамин (Q).

[0244] Иллюстративные гуманизированные антитела представляют собой гуманизированные формы 18С5 мыши, обозначенные гум18С5.

[0245] Антитело 18С5 мыши содержит зрелые вариабельные 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 вариабельные области тяжелой цепи: гум18С5-VH\_v1 и гум18С5-VH\_v2. Согласно данному изобретению дополнительно предложены 2 иллюстративные гуманизированные зрелые вариабельные области легкой цепи: гум18С5-VL\_v1 и гум18С5-VL\_v2. Выравнивание 18С5 мыши и различных гуманизированных антител продемонстрировано для вариабельных областей легкой цепи (Таблица 6 и Фиг. 4) и вариабельных областей тяжелой цепи (Таблица 7 и Фиг. 3).

[0246] 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 вариабельной области человека и, следовательно, потенциально иммуногенен, повышает потенциал к агрегированию, и другим причинам, следующие 8 позиций в каркасе вариабельной области 18С5 были рассмотрены в качестве кандидатов на замещения в 2-ух иллюстративных зрелых вариабельных областях легкой цепи, и в 2 иллюстративных зрелых вариабельных 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).

[0247] 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 вариабельной области, первый упомянутый остаток является человеческим, а в пределах CDR, первый упомянутый остаток является мышиным.

[0248] Области CDR таких гуманизированных антител могут быть идентичными или по существу полностью идентичными областям CDR 18C5 мышиного 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.

[0249] Каркасные позиции вариабельных областей соответствуют нумерации по Кабату, если не указано иное.

[0250] Возможностью для дополнительных вариаций в гуманизированных вариантах 18С5 являются дополнительные обратные мутации в каркасах вариабельной 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.

[0251] Некоторые замены или обратные мутации в вариантах гум18С5 (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 18С5, является по существу, такой же, то есть в пределах экспериментальной погрешности, как и у 18С5 мыши).

# D. Химерные и венированные антитела

[0252] В данном изобретении дополнительно предложены химерные и венированные формы нечеловеческих антител, в частности антитела 18С5 примеров.

[0253] 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 мышиного 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.

[0254] 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 п

существу полностью из нечеловеческого антитела, и каркасы вариабельной области нечеловеческого антитела делают более подобными таковым человека с помощью замен. Венированные формы антитела 18С5 включены в изобретение.

#### Е. Антитела человека

[0255] Человеческие антитела к мономерному TTP или его фрагменту (например, аминокислотным остаткам 101-109 (SEQ ID NO: 30 TTP) 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 TTP, такой как вариант TTP, содержащий только аминокислотные остатки 101-109 TTP, в качестве целевого антигена, и/или скрининг антител против набора вариантов TTP, таких как варианты TTP, содержащие различные мутации в аминокислотных остатках 101-109 TTP.

[0256] 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 Кисherlapati, 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

[0257] 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, (АЗКЦ), будь антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность TO антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или зависимая ОТ комплемента цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека могут вызывать зависимую от комплемента цитотоксичность, а изотипы 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 нумерация 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).

[0258] 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-опосредованая 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 Гсу, в частности к рецептору ГсуRI (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: 27. В некоторых антителах, изотипом является IgG2 или IgG4 человека.

[0259] 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 Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых зрелые вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены через спейсер.

[0260] Константные области антитела человека продемонстрируют аллотипическую вариацию и изоалотипическую 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 неполиморфной 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

[0261] Известен ряд способов продуцирования химерных и гуманизированных антител с использованием клеточной линии, экспрессирующей антитела (например, гибридомы). Например, иммуноглобулиновые вариабельные области антител могут быть клонированы и секвенированы с использованием хорошо известных способов. В одном способе, вариабельную область VH тяжелой цепи клонируют с помощью 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.

[0262] Аналогичным образом можно клонировать вариабельную область VL легкой цепи. В одном подходе, набор консенсусных праймеров предназначен для амплификации областей VL используя 5'-праймер, предназначенный для гибридизации с областью VL, включающей кодон инициации трансляции, и 3'-праймер, специфический к области Ck 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.

[0263] В одном из подходов, вариабельные области тяжелой и легкой цепей реконструируют для того, чтобы они кодировали сплайс-донорные последовательности после соответствующих соединений VDJ или VJ, и клонируют в вектор для экспрессии в клетках млекопитающего, такой как рСМV-hγ1 для тяжелой цепи и рСМV-Mcl для легкой цепи. Эти векторы кодируют константные области γ1 и Сk человека как экзонные фрагменты после вставленной кассеты с вариабельной областью. После проверки последовательности, векторы экспрессии с тяжелой цепью и легкой цепью могут быть совместно трансфицированы в клетки СНО для того, чтобы продуцировать химерные антитела. Среду, частично использованную клетками, собирают через 48 часов после трансфекции и анализируют вестерн-блоттингом на продуцирование антител, или ИФА на связывание антигена. Химерные антитела гуманизированы, как описано выше.

[0264] Химерные, венированные, гуманизированные и человеческие антитела обычно рекомбинантной продуцируют cпомощью 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 способных трансформировать трансфицировать системами векторах, или

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.

[0265] 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.

[0266] *Е. соli* 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 С и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы.

[0267] 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 клетокхозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают в себя клеточные линии CHO, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки НЕК293, 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 последовательности терминации транскрипции. И Контролирующие экспрессию последовательности могут включать в себя промоторы, полученные из: эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и тому подобных. Смотрите, Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

[0268] 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.

[0269] 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 сепбя использование полибрена, слияние протопластов, липосомы, электропорацию и микроинъекцию. Для получения трансгенных животных, трансгены могут быть микроинъекцированы в оплодотворенные ооциты, или могут быть внесены в геном эмбриональных стволовых клеток, а ядра таких клеток перенесены в избавленные от ядра ооциты.

[0270] После введения вектора(-ов), кодирующего тяжелые и легкие цепи анитела, 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, продуцированые 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 Віасоге. Выбранный клон затем может быть перенесен в несколько флаконов и сохранен в замороженном виде для последующего использования.

[0271] 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)).

[0272] 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, W02008/019442, W02008/107388, W02009/027471 и US 5888809).

# IV. Активные иммуногены

[0273] Согласно данному изобретению также предложены способы лечения или осуществления профилактики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающие в себя введение агента, индуцирующего иммунный ответ, включая антитела против ТТР. Агент может индуцировать антитела сам по себе и/или когда он связан с носителем и/или в присутствии адъюванта. Такой агент, используемый для активной иммунизации, служит для индуцирования у пациента тех же типов антител, которые описаны выше в связи с пассивной иммунизацией. Некоторые такие способы включают в себя введение субъекту иммуногена, содержащего эпитоп, с которым антитело 18С5 специфически связывается в режиме, эффективном для создания антител к ТТР. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот ТТР с которыми специфически связывается 18С5. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот из остатков 89-127 ТТР. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 11 смежных аминокислот из остатков 100-110 ТТР. В некоторых способах, иммуноген содержит пептид ТТР из вплоть до 9 смежных аминокислот из остатков 101-109 ТТР. В некоторых способах, пептидный эпитоп ТТР состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 89-127 TTP. В некоторых способах, пептидный эпитоп TTP состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 100-110 ТТР. В некоторых способах, пептидный эпитоп TTP состоит из 4-9 смежных аминокислот из остатков 101-109 TTP. У некоторых пептидов ТТР, используемых в качестве иммуногенов, отсутствует эпитоп Т-лимфоцитов. Такие пептиды связаны с гетерологичным носителем для предоставления эпитопа Тлимфоцитов.

[0274] Для индукции антител, связывающихся с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и 18С5, можно картировать эпитопную специфичность этих антител (например, путем исследования связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих ТТР). Фрагмент ТТР, состоящий из, или включающий в себя, или перекрывающий эпитоп, затем может быть использован в качестве иммуногена.

[0275] Необязательно, пептиды ТТР связаны с гетерологичным носителем и/или вводятся в комбинации с адъювантом, чтобы помочь вызвать выработку антител. Гетерологичный носитель и адъювант, если они используются, могут быть такими же, как и используемые для получения моноклонального антитела, но также могут быть выбраны для лучшей фармацевтической пригодности для применения у людей. Подходящие носители включают себя сывороточные альбумины, гемоцианин лимфы улитки, иммуноглобулиновые молекулы, тиреоглобулин, овальбумин, анатоксин столбняка или анатоксин из других патогенных бактерий, таких как дифтерия (например, CRM197), Е. coli, холера или H. pylori, или ослабленное производное токсина. Т-клеточные эпитопы также являются подходящими молекулами-носителями. Некоторые конъюгаты могут быть сформированы путем соединения агентов согласно данному изобретению с иммуностимулирующей полимерной молекулой (например, трипальмитоил-S-глицерин цистеин ( $Pam_3Cys$ ), маннаном (полимер маннозы) или глюканом (полимер  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2)), цитокинами (например, ИЛ-1, альфа- и β-пептиды ИЛ-1, ИЛ-2, γ-ИФН, ИЛ-10, GM-CSF) и хемокинами (например, MIP1-α и β, и RANTES). Иммуногены могут быть соединены с носителями с или без аминокислотных спейсеров (например, gly-gly). Дополнительные носители включают в себя вирусоподобные частицы. Вирусоподобные частицы (ВПЦ), также называемые псевдовирионами или вирус-производными частицами, представляют собой субъединичные структуры, состоящие из множества копий вирусного капсида и/или белковой оболочки, способных к самоорганизации в ВПЦ с определенной сферической симметрией in vivo. (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) В альтернативном варианте, пептидные иммуногены могут быть соединены по меньшей мере с одним искусственным Т-клеточным эпитопом, способным связываться с большой долей молекул MHC класса II, например, эпитопом pan-DR («PADRE»). PADRE описано в US 5736142, WO 95/07707, и Alexander J et al, Immunity, 1:751-761 (1994). Активные иммуногены могут быть представлены в мультимерной форме, в которой множество копий иммуногена и/или его носителя представлены в виде одной ковалентной молекулы.

[0276] Фрагменты часто вводят с фармацевтически приемлемыми адъювантами. Адъювант увеличивает титр индуцированных антител и/или аффинность связывания

индуцированных антител по сравнению с ситуацией, когда пептид использовался Различные адъюванты могут быть использованы в комбинации с иммуногенным фрагментом ТТР, чтобы вызвать иммунный ответ. Предпочтительные адъюванты усиливают действительный ответ на иммуноген, конформационных изменений в иммуногене, которые влияют на качественную форму ответа. Предпочтительные адъюванты включают в себя соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPL<sup>TM</sup>) (смотрите, GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Гамильтон, Монтана, теперь часть Corixa). Stimulon<sup>TM</sup> QS-21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева Quillaja Saponaria Molina, найденного в Южной Америке (смотрите, Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5057540), (Aquila BioPharmaceuticals, Фреймингем, Maccarycetc; сейчас Antigenics, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк). Другими адъювантами являются эмульсии масла в воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид А (Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), плюроновые полимеры и убитые микобактерии. Адъюванты Риби представляют собой эмульсии масло-в-воде. Риби содержит метаболизируемое масло (сквален), эмульгированное солевым раствором, содержащим Твин 80. Риби также содержит очищенные микобактериальные продукты, которые действуют как иммуностимуляторы и бактериальный монофосфориллипид А. Другим адъювантом является CpG (WO 98/40100). Адъюванты можно вводить в качестве компонента терапевтической композиции с активным агентом, или можно вводить отдельно, до, одновременно или после введения терапевтического агента.

[0277] Также могут быть использованы аналоги природных фрагментов ТТР, которые индуцируют антитела против ТТР. Например, одна или большее количество, или все L-аминокислоты могут быть замещены D-аминокислотами в таких пептидах. Также порядок аминокислот может быть обратным (ретро-пептид). Необязательно, пептид содержит все D-аминокислоты в обратном порядке (ретро-инверсо-пептид). Пептиды и другие соединения, которые необязательно имеют значительное сходство аминокислотной последовательности с пептидами ТТР, но тем не менее служат миметиками пептидов ТТР, и индуцируют сходный иммунный ответ. Также могут быть использованы анти-идиотипические антитела против моноклональных антител к ТТР, как описано выше. Такие анти-Id-антитела имитируют антиген и генерируют иммунный ответ на него (смотрите, Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

[0278] Пептиды (и необязательно носитель, слитый с пептидом) также можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, и экспрессироваться *in situ* в пациенте. Сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий иммуноген, обычно соединяют с регуляторными элементами, такими как промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию сегмента ДНК в надлежащих клетках-мишенях пациента. Для экспрессии в клетках крови, как желательно для индукции иммунного ответа, для прямой экспрессии подходят промоторные и энхансерные элементы из иммуноглобулиновых генов легкой или тяжелой цепи, или основной промежуточный ранний промотор и энхансер СМV. Присоединенные регуляторные элементы и кодирующие последовательности часто клонируют в вектор. Антитела также можно вводить в форме нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи антитела. Если присутствуют как тяжелые, так и легкие цепи, цепи предпочтительно соединяют в виде одноцепочечного антитела. Также могут быть получены антитела для пассивного введения, например, с помощью аффинной хроматографии из сыворотки пациентов, которых лечили пептидными иммуногенами.

[0279] ДНК может быть доставлена в голой форме (т. е. без коллоидных или инкапсулирующих материалов). В альтернативном варианте, может быть использован ряд вирусных векторных систем, включая ретровирусные системы (смотрите, например, Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); аденовирусные векторы (смотрите, например, Bett et al., J. Virol. 67, 591 1 (1993)); адено-ассоциированные вирусные векторы (смотрите, например, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), вирусные векторы из семейства осп, включая вирус осповакцины и вирусы птичьей оспы, вирусные векторы из рода альфа-вирусов, такие как полученные из вирусов Синдбис и леса Семлики (смотрите, например, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), вирус венесуэльского энцефалита (смотрите US 5643576) и рабдовирусы, такие как вирус везикулярного стоматита (смотрите WO 96/34625) и папилломавирусы (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 и Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

[0280] ДНК, кодирующая иммуноген или вектор, содержащий его, может быть упакована в липосомы. Подходящие липиды и родственные аналоги описаны в US 5208036, US 5264618, US 5279833 и US 5283185. Векторы и ДНК, кодирующие иммуноген, также могут быть адсорбированы на или связаны с носителями в виде частиц, примеры которых включают в себя полиметилметакрилатные полимеры и полилактиды, и поли(лактид-когликолиды) (смотрите, например, McGee *et al.*, *J. Micro Encap* 1996).

## Н. Скрининговые исследования антитела

[0281] 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 ΜΟΓΥΤ подвергать скринингу антитела, которые связываются аминокислотными остатками 101-109 (SEQ ID NO: 30) TTP, которые представляют собой эпитоп, скрытый в нативном тетрамере ТТР, и экспонированный в мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формах ТТР. Активные иммуногены также могут быть подвергнуты скринингу на способность вызывать продуцирование антител с такой специфичностью связывания. В этом случае, активный иммуноген используется для иммунизации лабораторного животного, и полученные сыворотки исследуют на соответствующую специфичность связывания. Антитела также могут быть подвергнуты скринингу на способность связывать пре-фибриллярные, 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 к ткани, подверженной ТТР-опосредованному амилоидозу, но не к здоровой ткани. Такие исследования иногда проводят вместе с конкурентным иллюстративным антителом, таким как антитело, имеющее вариабельные области 18С5, или изотипа каппа IgG1. Необязательно, в таком анализе иммобилизуют или антитело, или ТТР-цель.

[0282] Исследования функциональности могут быть выполнены в клеточных моделях, включая клетки, естественно экспрессирующие TTP, или клетки трансфицированные ДНК, кодирующим TTP или его фрагмент. Подходящие клетки включают клетки, полученные из сердечной ткани или других тканей, пораженных TTP амилоидогенезом. Клетки могут быть подвергнуты скринингу на пониженные уровни мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTP (например, путем вестерн-блоттинга, или путем иммунопреципитации клеточных экстрактов или супернатантов) или на сниженную токсичность, приписываемую мономерной,

неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формам TTP. Например, антитела могут быть исследованы на способность ингибировать или уменьшать агрегацию TTP, ингибировать или уменьшать образование фибрилл TTP, уменьшать отложение TTP, удалять агрегированный TTP или стабилизировать нетоксичные конформации TTP.

[0283] Могут быть выполнены в растворе другие функциональные анализы, такие как проверка того, способно ли антитело нарушать или уменьшать формирование 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, оснащенном блоком управления температурой. Также может быть использован тиофлавин-Т для оценки степени формирования амилоидных фибрилл. Например, пятикратный молярный избыток тиофлавина-Т можно добавить к образцам 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.

[0284] Исследования с применением животных моделей тестируют на способность антитела или активных иммуногенов 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 излишек амилоидных отложений в различных тканях, таких как желудочно-кишечный тракт или сердце. Активные иммуногены также можно исследовать на индукцию антител в сыворотке крови. 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), или контрольный иммуноген, 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 наслведсвенных 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).

[0285] Клинические испытания исследуют безопасность и эффективность для человека, имеющего заболевание, связанное с амилоидозом TTP.

# I. Нуклеиновые кислоты

[0286] В данном 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 37 (легкая цепь), которые могут кодироваться SEQ ID NO: 36 (тяжелая цепь) и 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 раздельными, например, каждая клонирована в свой собственный вектор экспрессии.

#### J. Конъюгированные антитела

[0287] Конъюгированные антитела, специфически связывающиеся с антигенами, экспонироваными в патогенных формах TTP, но не в нативной тетрамерной форме TTP, такими как аминокислотные остатки 101-109 (SEQ ID NO: 30) TTP, полезны для: обнаружения присутствия мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTP; наблюдения и оценки эффективности терапевтических агентов, используемых для лечения пациентов с диагнозом амилоидоз TTP; ингибирования или уменьшения агрегации TTP; ингибирования или уменьшения формирования фибрилл TTP; уменьшения или удаления отложений TTP; стабилизации нетоксичных конформаций TTP; или лечения или осуществления профилактики амилоидоза TTP 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.

[0288] 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 c нативной тетрамерной формой TTP. 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.

[0289] Примеры подходящих терапевтических фрагментов себя включают 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, ALN-TTP01. ALNTTP02, антисмысловыми олигонуклеотидами, такими как IONIS-TTPRx (инотерсен), миРНК, такими как патизиран или ревусиран, доксициклином (докси), таурорсодезоксихолевой кислотой (ТУДХК), докси-ТУДХК, циклодекстрином (СуD), 4'-йод-4'-дезоксидоксорубицином (ЙДОК), (EGCG), ресвератролом (3,5,4)эпигаллокатехин галлатом куркумином, 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 TTP. 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.

[0290] 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 С-концевыми концами антител для создания би- и триспецифических 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).

[0291] 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, отличающимися от таковых 18С5, могут включать в себя антитела, как в Таблице 3.

[0292] 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 таких определений 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, флюорофори DyLight, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид родамин, или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как люминол; биолюминесцентные материалы, такие как люцифераза, люциферин и аэкорин; радиоактивные материалы, такие как иттрий<sup>90</sup> (90Y), радиосеребро-111, радиосеребро-199, висмут<sup>213</sup>, йод (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I,), углерод  $(^{14}\text{C})$ , сера  $(^{5}\text{S})$ , тритий  $(^{3}\text{H})$ , индий  $(^{115}\text{In}, ^{113}\text{In}, ^{112}\text{In}, ^{111}\text{In})$ , технеций  $(^{99}\text{Tc})$ , таллий  $(^{201}\text{Ti})$ , галлий ( $^{68}$ Ga,  $^{67}$ Ga), палладий ( $^{103}$ Pd), молибден ( $^{99}$ Mo), ксенон ( $^{133}$ Xe), фтор ( $^{18}$ F),  $^{153}$ Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn, и <sup>117</sup>Tin; 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 SULFO-TAG NHS-Ester (SULFO-TAG) (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд).

[0293] Соединение радиоизотопов с антителами может быть выполнено с использованием обычных бифункциональных хелатов. Для присоединения радиосеребра-111 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 90Yиритримомаб-тиуксетана, соответственно. Смотрите, Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol., 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[0294] Терапевтические фрагменты, другие белки, другие антитела и/или детектируемые метки могут быть соединены или конъюгированы, прямо или косвенно через промежуточное звено (например, линкер), с мышиным, химерным, венированным, или гуманизированным антителом 18С5, 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., Іттиної. 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

[0295] Вышеуказанные антитела могут быть использованы для лечения или осуществления профилактики заболевания у пациента, имеющего заболевание 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 действия, обусловленные дополнительные механизмы конъюгированным иметь фрагментом.

[0296] 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.

[0297] Частота введения зависит от периода полужизни антитела в системе кровообращения, состояния пациента и пути введения среди прочих факторов. Частота быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента 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.

[0298] 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

[0299] 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) или кардиомиопатия или гипертрофия у атлетов или других людей, выполняющие экстремальные аэробные упражнения, 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). Амилоидоз ТТР также может быть связан в виде причины или результата различных заболеваний и патологий, характеризующихся дегенерацией или травмой ткани или органа. Накопление отложений ТТР способствует дисфункции органов или тканей, связанной с заболеванием или патологией. Примером такой патологии, поддающейся лечению или профилактике с помощью агентов и способов согласно изобретению, является стеноз позвоночного канала (Westermark et al., Upsala J., Medical Sciences 119, 223-238 (2014) и Yanagisawa et al., Modern Pathology 28, 201-207 (2015). Другим заболеванием, также поддающимся лечению или профилактике, является остеоартрит (Takanashi et al., Amyloid 20, 151-155 (2013), Gu et al., Biomed & Biotechnol. 15, 92-99; Takinami et al., Biomarker Insights 8, 85-95 (2014); Akasaki et al., Arthritis Rheumatol. 67, 2097-2107 (2015). Другим заболеванием, также поддающимся лечению или профилактике, является ревматоидный артрит (Clement et al., JCI Insight 1 epublish (2016). Другим заболеванием, поддающимся лечению или профилактике, является ювенильный идиопатический артрит (Sharma et al., PLoS One 9, e93905; 1-12 (2014). Другим

заболеванием, поддающимся лечению или профилактике, является возрастная дегенерация желтого пятна (влажная или сухая). Другим классом патологий, также поддающихся лечению или профилактике, являются нарушения связок и сухожилий, такие как нарушения вращающей манжеты плеча (Sueyoshi *et al.*, *Human Pathol.* 42, 1259-64 (2011).

[0300] Антитела, описанные выше, могут быть включены в фармацевтическую композицию для применения в лечении или профилактике любого из вышеуказанных заболеваний и патологий. В целом, как правило, антитело или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Пациенты, поддающиеся лечению, включают индивидов с риском амилоидоза TTP, но не проявляющих симптомов, а также пациентов, которые в настоящее время проявляют симптомы. Некоторых пациентов можно лечить во время продромальной стадии амилоидоза TTP.

[0301] Фармацевтические композиции можно вводить профилактически лицам, имеющим известный генетический риск амилоидоза TTP. 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 TTP, связанные с амилоидозом TTP), включая использование диагностических способов, представленных в данном документе. Например, в гене, кодирующем TTP, более 100 мутаций, которые вовлечены в амилоидоз TTP. 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).

[0302] Индивиды, страдающие от амилоидоза TTP могут иногда быть распознаны по клиническим проявлениям амилоидоза TTP, включая одно или большее количество из следующих: 1) семейный анамнез нейропатического заболевания, особенно связанного с сердечной недостаточностью; 2) невропатическая боль или прогрессирующие сенсорные нарушения неизвестной этиологии; 3) синдром кистевого туннеля без очевидной причины, особенно если он двусторонний и требует хирургического устранения; 4) нарушения моторики желудочно-кишечного тракта или дисфункция автономной нервной системы неизвестной этиологии (например, эректильная дисфункция, ортостатическая гипотензия, нейрогенный мочевой пузырь); 5) сердечная болезнь, характеризующаяся утолщенными стенками желудочков в отсутствие гипертонии; 6) расширенный по неизвестным причинам атрио-вентрикуляный 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 массидентификация TTP, спектроскопическая чтобы гарантировать, что белокпредшественник, ответственный за формирование амилоида, действительно является ТТР. Для наследственных форм заболеваний, необходимо продемонстрировать мутацию в гене, кодирующем ТТР, до постановки окончательного диагноза.

[0303] 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 TTP в образцах плазмы, полученных от субъекта, по сравнению с контрольными образцами, как описано в примерах.

[0304] 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 101-109) со временем. Если ответ снижается, требуется усиливающая его доза.

[0305] В профилактических применениях, антитело, или агент для вызова продуцирования антитела, 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 TTP), схемой (доза, частота и способ введения), эффективной чтобы улучшить или по меньшей мере воспрепятствовать дальнейшему ухудшению по меньшей мере одного признака или симптома заболевания.

[0306] 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 р < 0,05 или 0,01 или даже 0,001.

[0307] Эффективная схема лечения антителом может быть использована, например, для: ингибирования или уменьшения агрегации ТТР у субъекта, имеющего или подверженого риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; ингибирования или уменьшения формирования фибрилл ТТР у субъекта, имеющего или подверженого риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; уменьшения или удаления отложений ТТР, или агрегированного ТТР у субъекта, имеющего или подверженого риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; стабилизации нетоксичных конформаций ТТР у субъекта, имеющего или подверженого риску приобретения патологии, связанной с накоплением ТТР; ингибирования токсических эффектов агрегатов, фибрилл или отложений ТТР у субъекта, имеющего или подверженого 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.

[0308] 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.

[0309] 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.

[0310] 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.

[0313] Количество агента для активного введения варьирует от 0,1-500 мкг/пациент, и более обычно от 1-100 или 1-10 мкг/инъекция для введения человеку. Дозировка относится к массе активного агента для иммунизации, не включая носитель, с которым он связан, чтобы помочь вызвать иммунный ответ. Частота инъекций может значительно варьироваться от одного раза в день до одного раза в год, или одного раза в десятилетие. Типичная схема включает в себя иммунизацию с последующими бустерными инъекциями через определенные интервалы времени, такие как интервалы 6 недель или два месяца. Другая схема включает в себя иммунизацию с последующей бустерной инъекцией через 1, 2 и 12 месяцев. Другая схема включает в себя инъекцию каждые два месяца в течение всей жизни. В альтернативном варианте, бустерные инъекции могут быть нерегулярными, по показаниям мониторинга иммунного ответа.

[0311] Антитела или агенты для индукции антител можно вводить периферическим путем. Пути введения включают в себя местный, внутривенный, оральный, подкожный, внутриартериальный, внутричерепный, интратекальный, внутрибрюшинный, интраназальный или внутримышечный. Иллюстративные пути введения антител могут представлять собой внутривенный или подкожный путь. Иллюстративными путями

активной иммунизации являются подкожный и внутримышечный. Внутривенное введение может осуществляться, например, путем инфузии в течение периода, такого как 30-90 мин. Этот тип инъекции чаще всего выполняется в мышцы рук или ног. В некоторых способах, агенты вводят непосредственно в определенную ткань, где накапливаются отложения, например, путем внутричерепной инъекции.

[0312] Фармацевтические композиции для парентерального введения могут быть стерильными и, по существу, изотоническими (250-350 мОсм/кг воды) и изготавливаться 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 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 апирогенной водой.

[0313] 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 TTP, или Vvndagel, стабилизатора TTP в тетрамерной форме. Такие агенты могут включать в себя стабилизаторы тетрамера ТТР, например тафамидис 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 № ЈР5896175) или миРНК, например WO2016033326), патизиран или ревусиран (смотрите, например, разлагающие амилоид, такие как доксициклин (докси), тауроурсодеоксихолевая кислота (ТУДХК), докси-ТУДХК, циклодекстрин (CyD), 4'-йод-4'-дезоксидоксорубицин (ЙДОК) или антитела к компоненту сывороточного амилоида P (SAP).

[0314] 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.

[0315] 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 раздельно. Некоторые примеры видов лечения, полезных для комбинированных терапий, включают в себя второе анти-TTP антитело, которое связывается с эпитопом, отличным от эпитопа 18С5, например антитело, раскрытое в Таблице 3.

[0316] 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. Количества 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). 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.

[0317] Количества 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), амилоидвизуализирующий пептид р31 (биораспределение амилоид-визуализирующего пептида р31, 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.

### А. Способы диагностики и мониторинга

[0318] 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 продемонстрирует непосредственный пик концентрации антител с последующим экспоненциальным разрушением. Без дополнительной дозы распад приближается к предшествующим лечению уровням в период от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от периода полужизни вводимого антитела. Например, период полужизни некоторых антител человека составляет порядка 20 дней.

[0319] 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.

[0320] Также предложены способы обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной, или фибрильной форм TTP у субъекта, например, путем измерения амилоида TTP или патогенных форм TTP (например, мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTP) в образце из субъекта или путем

*in vivo* визуализации TTP у субъекта. Такие способы полезны для диагностики или подтверждения диагноза заболеваний, связанных с такими патогенными формами TTP (например, амилоидоза TTP) или восприимчивостью к ним. Также могут быть использованы способы для бессимптомных субъектов. Наличие мономерных, неправильно свернутых, агрегированных или фибрильных форм TTP 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 TTP.

[0321] 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.

[0322] 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 антитело. захватывающее Например, меченое захватывающее антитело представлять собой 18С5, или его гуманизированный, химерный или венированный вариант. В некоторых анализах, используются меченые репортерные антитела. Например, меченое репортерное антителом может представлять собой 18C5, гуманизированный, химерный или венированный вариант. Меченое репортерное антитело также может представлять собой антитело из Таблицы 3, или его гуманизированный, Меченое репортерное химерный или венированный вариант. 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 8С3 или 7G7, или его гуманизированный, химерный или венированный 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. № А000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Санта-Клара, Калифорния). В одном варианте осуществления, поликлональное кроличье анти-TTP-антитело представляет собой Sigma, кат. № HPA002550 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури).

[0323] 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 свернутые формы и нативную тетрамерную форму). В некоторых таких анализах используют захватывающее антитело, которое специфически связывается с 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 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или их химерные

варианты или гуманизированные варианты. Такие репортерные антитела могут включать в себя 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. 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).

[0324] 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 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 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.

[0325] 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 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 обнаруживает мультимерный неправильно предпочтительно по сравнению с мономерным неправильно свернутым ТТР. Во втором анализе можно использовать захватывающее антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 ТТР, и репортерное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в пределах остатков 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 TTP в мультимерном неправильно свернутом TTP, 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 TTP. В некоторых таких анализах, обнаружение связывания репортерного антитела, которое связывается с второй неправильно свернутой молекулой TTP в мультимерном TTP, указывает на присутствие или отсутствие мультимерного неправильно свернутого TTP. В некоторых анализах, рассчитывают соотношение мультимерного неправильно свернутого TTP и всех неправильно свернутых TTP.

[0326] 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 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 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).

[0327] Способы визуализации *in vivo* могут работать путем введения реагента, такого как антитело, которое связывается с мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной формами TTP в субъекте, а затем обнаружения реагента после того, как

он связался. Такие антитела обычно связываются с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP. 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.

[0328] 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).

[0329] 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.

[0330] Наблюдение за изменением количества неправильно свернутого TTP, мультимерного неправильно свернутого TTP, отложений транстиретина, связывания анти-TTP 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 обеспечивает положительный эффект для пациента. Изменения не вышеприведенных параметрах ТТР могут также сочетаться с другими изменениями в таких как побочные эффекты при определении показателях или симптомах, необходимости и способа корректировки лечения.

[0331] У некоторых пациентов, наблюдение продемонстрирует, что количество неправильно свернутого ТТР, мультимерно неправильно свернутого ТТР, отложений 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.

[0332] У некоторых пациентов, наблюдение указывает на обнаруживаемое снижение количества неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений транстиретина, связывания анти-ТТР антитела и т. п., но такое количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений 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.

[0333] Если наблюдение указывает на то, что количество неправильно свернутого ТТР, мультимерного неправильно свернутого ТТР, отложений 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, отложений 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, отложений 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.

[0334] 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 квартиле 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.

[0335] 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 больш количеством других агентов.

[0336] Диагностические способы с антителами, раскрытыми в данном документе, могут быть выполнены в комбинации с вторым анти-TTP антителом, которое связывает эпитоп, отличный от эпитопа 18С5, например антителом, раскрытым в Таблице 3.

[0337] Также предложены способы различения транстиретин-опосредованный амилоидоз от не-ТТР амилоидоза, например, амилоидоза с амилоидом легкой цепи (АЛ), также известного как первичный системный амилоидоз.

## IX. Набори

[0338] В данном изобретении дополнительно предложены наборы (например, контейнеры), содержащие гуманизированные антитела 18С5, 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.

[0339] 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.

[0340] 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.

## Х. Другие применения

[0341] 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.

[0342] 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 присутствия 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. присутствие 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 присутствие мономерной, оцениваниями (т.е. неправильно агрегированной или фибрильной форм ТТР). Если проведено больше чем два измерения, измерения могут быть проанализированы как период действия, начинающийся до лечения терапевтическим агентов, и длящийся все время терапии. Для пациентов, у которых уменьшилось связывание антител с биологическими образцами (т. е. присутствие 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 TTP.

[0343] Антитела также могут быть использованы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований, для обнаружения мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTP 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 TTP, или партнеров по связыванию мономерной, неправильно свернутой, агрегированной или фибрильной форм TTP, например, с помощью аффинной хроматографии.

[0344] 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.

[0345] 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

<u>Пример 1.</u> Приготовление иммуногена, и иммунизация мышей к 18C5

[0346] Самкам мышей BALB/с и C57BL/6 инъецировали транстиретин, сконструированный с мутацией по F87M и L110M, называемый двойным мутантом по транстиретину (ТТР-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, ТТР-ДМ, эмульгированного в адъюванте RIBI, еженедельно с использованием 5 ВАLВ/с, дополнительно 5 С57ВL/6 мышам давали 3 инъекции по 50 мкг/мышь, 3 инъекции по 25 мкг/мышь, и 4 инъекции по 10 мкг/мышь, эмульгированные в адъюванте RIBI. Мышей титровали против ТТР-ДМ, нативного тетрамерного ТТР и his-МСАМ. Мыши с наивысшими титрами ТТР-ДМ и наименьшими титрами нативного тетрамерного ТТР и his-МСАМ (ВАLВ/с № 1 и 5, и С57ВL/6 № 4 и 5) были гибридизованы с помощью модификации Келера и Мильштейна. Полученные в результате гибридомы подвергали скринингу против ТТР-ДМ, нативного тетрамерного ТТР и his-МСАМ. Гибридомы, проявляющие специфичность к ТТР-ДМ, были клонированы и дополнительно охарактеризованы. Было идентифицировано 18С5.

#### Пример 2. Характеристика 18C5 с помощью BIAcore

[0347] Анализ проводили с использованием Віасоге Т200 для сравнения аффинности связывания антител мыши с рекомбинантным ТТР человека, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-чТТР), ТТР яванского макака, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (Гу-яТТР), и нативным тетрамерным ТТР человека. Антимышинное антитело иммобилизовали на сенсорном чипе СМЗ (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-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-HCl) с временем ассоциации 300 с и временем диссоциации 900 с. Регенерацию поверхности чипа осуществляли двумя короткими инъекциями 10 мМ глицина-НС1 при рН 1,7. Концентрации применяемого Гу-яТТР изменялись от 1 нМ до 1000 нМ, в то время как концентрации тетрамера ТТР 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 продемонстрированы в Таблице 4.

[0348] Таблица 4. Данные по связыванию 18С5 с неправильно свернутым ТТР человека и неправильно свернутым ТТР яванского макака, и тетрамером ТТР человека.

ТТР	k <sub>a</sub> 1/Mc	k <sub>д</sub> 1/с	Кд нМ
Неправильно свернутый ТТР человека	1,1X10 <sup>5</sup>	6,2X10 <sup>-4</sup>	5,9 нМ
Неправильно свернутый ТТР яванского макака	1,0X10 <sup>5</sup>	9,2X10 <sup>-4</sup>	Минимальное связывание при высокой концентрации, трудно оценить Кд
Тетрамер ТТР человека	2,2X10 <sup>3</sup>	2,2X10 <sup>-4</sup>	Минимальное связывание при высокой концентрации, трудно оценить Кд

<u>Пример 3.</u> Характеристика химерного 18C5 с помощью BIAcore

[0349] Анализ проводили с использованием Віасоге Т200 для сравнения аффинности связывания мышиного 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 СМЗ (GE Healthcare Life Sciences) посредством аминного связывания, химерные и мышиные 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 (НВЅ + 0,05% Р-20, 1 мг/мл БСА, 50 мМ Гу-НСІ) 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-НСІ 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 Віасоге

Evaluation (v3.0), с индексом совокупного показателя преломления равным нулю ОЕ. Данные по связыванию продемонстрированы в Таблице 5.

[0350] Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи химерного антитела 18С5 представлена как SEQ ID NO: 81, аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи химерного антитела 18С5 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.

[0351] Таблица 5. Данные по связыванию мышиного и химерного антител с рекомбинантным ТТР человека, денатурированным в 6М гуанидин гидрохлориде (ГучТТР).

ТТР	k <sub>c</sub> 1/Mc	k <sub>от</sub> 1/с	Кд нМ
Химерное 18С5	1,3X10 <sup>5</sup>	1,6X10 <sup>-4</sup>	1,8 нМ
Мышиное 18С5	9,9X10 <sup>4</sup>	2,1X10 <sup>-4</sup>	2,2 нМ

### Пример 4. Эпитопное картирование 18С5

[0352] Первоначальное картирование продемонстрировало, что эпитоп для 18С5 находится в пределах 87-127 SEQ ID NO: 26. Дополнительное картирование продемонстрировало, что эпитоп лежал между 101-109 SEQ ID NO: 26. Гораздо более низкая аффинность к неправильно свернутому TTP яванского макака позволяет предположить, что аминокислота 104 является важной, поскольку это единственная аминокислотная замена между TTP человека и яванского макака.

## Пример 5. Последовательность 18С5

[0353] 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, 9х10<sup>6</sup> клеток гибридомного 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-A-хвостом мРНК. Загрязняющие вещества смывали и элюировали поли-A+ 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 рТОРО и трансформировали в E. coli Тор10. 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 Мет и областью С

Последовательность содержит ключевые признаки областей V антител

Последовательность содержит определяемые CDR.

Минимум три отдельных клона с соответствующими ОРС (открытой рамкой считывания)

[0354] Установленные последовательности вариабельной области клонировали в векторы экспрессии и трансфицировали в клетки СНО. Очищенное химерное антитело характеризовали на связывание с использованием 18С5 мыши в качестве контрольного антитела.

[0355] Аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области тяжелой цепи 18С5 представлена как SEQ ID NO: 81, и аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи 18С5 представлена как SEQ ID NO: 87. Аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи по совмещенной системе нумерации 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 системе нумерации Кабата/Чотиа представлены как SEQ ID NO: 11, 13 и 15, соответственно.

<u>Пример 6.</u> Специфичность 18С5, продемонстрированная с помощью анализа вестернблоттингом [0356] Чтобы продемонстрировать конформационную специфичность 18С5 по отношению к ненативному (денатурированному) ТТР, анализ вестерн-блоттингом выполняли следующим образом:

Методика:

[0357] ДСН-полиакриламидные гели

[0358] Нативный ТТР: 1,0, 0,5 и 0,1 мкг образца рекомбинантного ТТР человека в буфере для образцов LDS (Life Technologies) проганяли в 10% бис-трис-геле NuPAGE (буфер MES; 90 В, 105 мин) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны для анализа вестерн-блоттингом.

[0359] 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.

[0360] Анализ вестерн-блоттингом

[0361] 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 1х ТВЅ и помещали в 1:20000 разведение IRDye-800CW-конъюгированного козьего анти-мыша или анти-кролик вторичного антитела (LI-COR, Линкольн, Небраска), затем визуализировали на инфракрасном визуализаторе Odyssey CLx (LI-COR, Линкольн, Небраска).

[0362] Результаты и выводы:

[0363] Вестерн-блоттинг нативного в сравнение с денатурированным рекомбинантным ТТР (Фиг. 1) продемонстрировал, что 18С5 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 продемонстрирует маркеры молекулярной массы.

[0364] Напротив, коммерческое антитело TTP (Sigma, кат. № HPA002550), которое не является конформационно специфичным, не различало нативный и денатурированный TTP, и продемонстрировало очень сильную реактивность по отношению к мономерному,

а также димерному нативному и денатурированному ТТР (Фиг. 2). Дорожки 1-3 продемонстрируют результаты для нативного ТТР; Дорожка 4 продемонстрирует маркеры молекулярной массы, а дорожки 5-7 продемонстрируют результаты для денатурированного ТТР.

## Пример 7. Конструирование гуманизированных антител 18С5.

[0365] Исходной точкой или антителом-донором для гуманизации было антитело 18С5 мыши. Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи зрелого м18С5 представлена как SEQ ID NO: 81. Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи зрелого м18С5 представлена как SEQ ID NO: 87. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи по совмещенной системе нумерации 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.

[0366] Выравнивание последовательностей вариабельных областей 18С5 с консенсусными последовательностями вариабельных областей антител по Кабату, *et al.* указывает на то, что вариабельная область тяжелой цепи (VH) 18С5 принадлежит подгруппе 3b VH мыши, которая соответствует подгруппе 3 VH человека. Вариабельная область легкой цепи каппа (VL) 18С5 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.].

[0367] Остатки, которые встречаются в интерфейсе между доменами Vk и Vh, 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 Vh обычно представляет собой Asp, Gly или Ser. Эти позиции являются кандидатами на внесение обратных мутаций. Для цепи Vk Glu 34 обычно представляет собой Ala, His, Asn или Ser, и эти позиции являются кандидатами на внесение обратных мутаций.

[0368] CDR VH и VL 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.

[0369] 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 18С5. Кристаллическая структура Fab с №17 антитела анти-пироглутамат-Abeta мыши (код PDB - 5МҮК) [Piechotta, A. et al. ((2017) J. Biol. Chem. 292: 12713−12724) использовали как для структуры Vh, так и для структуры Vk, поскольку она имела хорошее разрешение (1,6А°) и общее сходство последовательностей с Vh и Vk 18С5, сохраняя одинаковые каноничные структуры для петель. Программное обеспечение Bioluminate было использовано для моделирования примерной структуры 18С5. Это программное обеспечение лицензировано Schrodinger Inc.

[0370] Каркасы VH и VL 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). Вариабельные домены 18C5 и CreneFab также имеют одинаковую длину для петель CDR-H1, H2, L1, L2 и L3. Каркасные области VH (5VZY-VH) и VL (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.

[0371] 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 гуманизированности 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 гуманизированности. Для гуманизированного 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.

[0372] Дополнительные варианты гум18С5-VH и гум18С5-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 Crenezumab Fab, или
- заняты остатками, которые являются редкими среди секвенированных человеческих антител, где либо исходный остаток 18С5 мыши, либо какой-либо другой остаток является гораздо более распространенным.

[0373] Были сконструированы 2 гуманизированных варианта вариабельной области тяжелой цепи и 2 гуманизированных 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 6 и 7). Иллюстративные гуманизированные конструкции Vk и Vh, с обратными мутациями и другими мутациями, основанными на выбранных каркасах человека, продемонстрированы в Таблицах 6 и 7, соответственно. Обозначенные жирным шрифтом области в Таблицах 6 и 7 обозначают CDR, определенные по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа. «-» обозначает отсутствие аминокислоты в указанной позиции. SEQ ID NO: 86 и 92 содержат обратные мутации и другие мутации, как продемонстрировано в Таблице 8. Аминокислоты в позициях гум18C5-VH v1 и гум18C5-VH v2 перечислены в Таблице 9. Аминокислоты в позициях гум18C5-VL v1 и гум18C5-VL v2 перечислены в Таблице 10. 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, продемонстрирован в Таблице 11.

Таблица 7: Гуманизированные области VL 18C5

№ остатка по линейной нумерации	№ остатка по Кабату		FR или CDR	VL 18C5 мыши (SEQ ID NO: 87)	(CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 89)	гум18С5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)	гум18С5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)
1	1	Fr1		D	D	D	D
2	2	Fr1		V	I	Ι	V
3	3	Fr1		L	V	V	V
4	4	Fr1		M	M	M	M
5	5	Fr1		T	Т	T	Т

7         7         Fr1         T         S         S         S           8         8         Fr1         P         P         P         P           9         9         Fr1         L         L         L         L         L           10         10         Fr1         S         S         S         S           11         11         Fr1         L         L         L         L         L           12         12         Fr1         P         P         P         P         P           13         13         Fr1         V         V         V         V         V           14         14         Fr1         S         T         T         T         T           15         15         Fr1         L         P         P         P         P           16         16         Fr1         G         G         G         G         G           17         17         Fr1         D         E         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P         P         P <th>6</th> <th>6</th> <th>Fr1</th> <th>Q</th> <th>Q</th> <th>Q</th> <th>Q</th>	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
9 9 Fr1 L L L L L 10 10 Fr1 S S S S S 11 11 Fr1 L L L L 12 12 Fr1 P P P P 13 13 Fr1 V V V V 14 14 Fr1 S T T T 15 15 Fr1 L P P P 16 16 Fr1 G G G G 17 17 Fr1 D E E E 18 18 Fr1 Q P P P 19 19 Fr1 A A A A 20 20 Fr1 S S S 21 21 Fr1 I I I I 22 22 Fr1 S S S 23 23 Fr1 C C C C 24 24 CDR-L1 R R R R 25 25 CDR-L1 S S S 27 27 CDR-L1 Q Q Q Q 28 27A CDR-L1 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 32 27E CDR-L1 S S S 33 27F CDR-L1 G G G 36 30 CDR-L1 N N N 35 29 CDR-L1 G G G 36 30 CDR-L1 N D N N 37 31 CDR-L1 T T T T 38 32 CDR-L1 T T T T	7	7	Fr1	T	S	S	S
10         10         Fr1         S         S         S         S           11         11         Fr1         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L	8	8	Fr1	P	P	P	P
11         11         Fr1         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         L         D         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P         P <td>9</td> <td>9</td> <td>Fr1</td> <td>L</td> <td>L</td> <td>L</td> <td>L</td>	9	9	Fr1	L	L	L	L
12         12         Fr1         P         P         P         P         P           13         13         Fr1         V         V         V         V         V           14         14         Fr1         S         T         T         T         T           15         15         Fr1         L         P         P         P         P           16         16         Fr1         G         G         G         G         G           17         17         Fr1         D         E         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A         A         A           20         20         Fr1         S         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I	10	10	Fr1	S	S	S	S
13         13         Fr1         V         V         V         V           14         14         Fr1         S         T         T         T           15         15         Fr1         L         P         P         P           16         16         Fr1         G         G         G         G           17         17         Fr1         D         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A         A	11	11	Fr1	L	L	L	L
14       14       Fr1       S       T       T       T         15       15       Fr1       L       P       P       P         16       16       Fr1       G       G       G       G         17       17       Fr1       D       E       E       E         18       18       Fr1       Q       P       P       P       P         19       19       Fr1       A       A       A       A       A         20       20       Fr1       S       S       S       S         21       21       Fr1       I       I       I       I       I         22       22       Fr1       S       S       S       S       S         23       23       Fr1       C       C       C       C       C       C         24       24       CDR-L1       R       R       R       R       R       R         25       25       CDR-L1       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S	12	12	Fr1	P	P	P	P
15         15         Fr1         L         P         P         P           16         16         Fr1         G         G         G         G           17         17         Fr1         D         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A         A           20         20         Fr1         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I           22         22         Fr1         S         S         S         S           23         23         Fr1         C         C         C         C         C           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           25         25         CDR-L1         S         S         S         S         S           27         27         CDR-L1         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q	13	13	Fr1	V	V	V	V
16         16         Fr1         G         G         G         G           17         17         Fr1         D         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A           20         20         Fr1         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I         I           22         22         Fr1         S         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I         I           22         22         Er1         S         S         S         S         S           23         23         Fr1         C         C         C         C         C           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           25         25         CDR-L1         S         S         S         S         S           27	14	14	Fr1	S	T	T	T
17         17         Fr1         D         E         E         E           18         18         Fr1         Q         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A           20         20         Fr1         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I           22         22         Fr1         S         S         S         S           23         23         Fr1         C         C         C         C         C           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           25         25         CDR-L1         S         S         S         S         S           26         26         CDR-L1         S         S         S         S         S           27         27         CDR-L1         Q         Q         Q         Q         Q           28         27A         CDR-L1         D         Y         D         D         D           31         2	15	15	Fr1	L	P	P	P
18         18         Fr1         Q         P         P         P           19         19         Fr1         A         A         A         A           20         20         Fr1         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I         I         I           22         22         Fr1         S         S         S         S         S           23         23         Fr1         C         C         C         C         C           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           25         25         CDR-L1         S         S         S         S         S           26         26         CDR-L1         S         S         S         S         S           27         27         CDR-L1         Q         Q         Q         Q         Q           28         27A         CDR-L1         I         L         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         D	16	16	Fr1	G	G	G	G
19       19       Fr1       A       A       A       A         20       20       Fr1       S       S       S       S         21       21       Fr1       I       I       I       I       I         22       22       Fr1       S       S       S       S         23       23       Fr1       C       C       C       C       C         24       24       CDR-L1       R       R       R       R       R       R         25       25       CDR-L1       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       S       <	17	17	Fr1	D	Е	Е	Е
20         20         Fr1         S         S         S         S           21         21         Fr1         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I	18	18	Fr1	Q	P	P	P
21         21         Fr1         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         R         S         S         S         S         S         S         S         S         S <td>19</td> <td>19</td> <td>Fr1</td> <td>A</td> <td>A</td> <td>A</td> <td>A</td>	19	19	Fr1	A	A	A	A
22         22         Fr1         S         S         S           23         23         Fr1         C         C         C         C           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           24         24         CDR-L1         R         R         R         R         R           25         25         CDR-L1         S         S         S         S         S           26         26         CDR-L1         S         S         S         S         S           27         27         CDR-L1         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         Q         D         D <td>20</td> <td>20</td> <td>Fr1</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td>	20	20	Fr1	S	S	S	S
23         23         Fr1         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         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I <td< td=""><td>21</td><td>21</td><td>Fr1</td><td>I</td><td>I</td><td>I</td><td>I</td></td<>	21	21	Fr1	I	I	I	I
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         Q           28         27A         CDR-L1         S         S         S         S         S           29         27B         CDR-L1         I         L         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I         I </td <td>22</td> <td>22</td> <td>Fr1</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td>	22	22	Fr1	S	S	S	S
25         25         CDR-L1         S         S         S           26         26         CDR-L1         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         N         N         N         N           34         28         CDR-L1         N         N         N         N           35         29         CDR-L1         N         D         N         N           37         31         CDR-L1         T         T         T         T         T           38         32         CDR-L1         Y         Y         Y         Y	23	23	Fr1	С	С	С	С
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         N         N         N         N           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         T           38         32         CDR-L1         Y         Y	24	24	CDR-L1	R	R	R	R
27         27         CDR-L1         Q         Q         Q         Q           28         27A         CDR-L1         S         S         S         S           29         27B         CDR-L1         I         L         I         I         I           30         27C         CDR-L1         V         V         V         V         V           31         27D         CDR-L1         D         Y         D         D         D           32         27E         CDR-L1         S         S         S         S           33         27F         CDR-L1         N         N         N         N           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         T           38         32         CDR-L1         Y         Y         Y         Y         Y	25	25	CDR-L1	S	S	S	S
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         N         N         N         N           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         T           38         32         CDR-L1         Y         Y         Y         Y	26	26	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         N         N         N         N           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         T           38         32         CDR-L1         Y         Y         Y         Y	27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q
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	28	27A	CDR-L1	S	S	S	S
31       27D       CDR-L1       D       Y       D       D         32       27E       CDR-L1       S       S       S       S         33       27F       CDR-L1	29	27B	CDR-L1	I	L	I	I
32       27E       CDR-L1       S       S       S         33       27F       CDR-L1	30	27C	CDR-L1	V	V	V	V
33       27F       CDR-L1	31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D
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	32	27E	CDR-L1	S	S	S	S
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	33	27F	CDR-L1		_	_	_
36         30         CDR-L1         N         D         N         N           37         31         CDR-L1         T         T         T         T         T           38         32         CDR-L1         Y         Y         Y         Y	34	28	CDR-L1	N	N	N	N
37 31 CDR-L1 T T T T 38 32 CDR-L1 Y Y Y Y	35	29	CDR-L1	G	G	G	G
38 32 CDR-L1 Y Y Y	36	30	CDR-L1	N	D	N	N
	37	31	CDR-L1	Т	T	Т	Т
39 33 CDR-L1 L L L	38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
	39	33	CDR-L1	L	L	L	L

40	34	CDR-L1	E	Н	E	Е
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	Е	Е	Е	Е
86	80	Fr3	A	A	A	A
87	81	Fr3	Е	Е	Е	Е
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	С	C	С	С
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	Н	Н	Н	Н
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	Т	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	Т	Т	Т	Т
115	103	Fr4	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V
117	105	Fr4	Е	Е	Е	Е
118	106	Fr4	L	I	I	I
119	106A	Fr4	_	_	_	_
120	107	Fr4	K	K	K	K

Таблица 7: Гуманизированные области VH 18C5

№ остатка по линейной нумерации	№ остатка по Кабату	FR или CDR	VH 18C5 мыши (SEQ ID NO: 81)	(CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 83)	гум18С5-VH_v1 (SEQ ID NO: 85)	гум18С5-VH_v2 (SEQ ID NO: 86)
1	1	Fr1	Е	Е	Е	Е
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	K	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	L	V	V	V
6	6	Fr1	Е	Е	Е	Е
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G

9	9	Fr1	G	G	G	G
10	10	Fr1	G	G	G	G
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	V	V	V	V
13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	S	S	S	S
18	18	Fr1	L	L	L	L
19	19	Fr1	N	R	R	R
20	20	Fr1	L	L	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	С	С	С	С
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	Е	Е	Е	Е
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	Е	S	Е	Е
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	Т	S	T	Т
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	Т	P	Т	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	Т	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	Т	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	Е	E	Е	Е
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	С	С	С	С
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	100 <b>C</b>	CDR-H3	A	_	A	A
112	100 <b>D</b>	CDR-H3	L	_	L	L
113	100E	CDR-H3	_	_	_	_
114	100F	CDR-H3	_	_	_	_
115	100 <b>G</b>	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	Т	T	Т	Т
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Таблица 8  $\label{eq: VH} \mbox{Обратные мутации $V_H$, $V_L$ и другие мутации для гуманизированного 18C5 }$ 

$ m B$ арианты $ m V_H$ или $ m V_L$	Экзонная акцепторная	Изменения в остатках
	последовательность $V_{ m H}$ или	акцепторных каркасов
	$ m V_L$	(на основе CDR
		совмещенной системе
		нумерации
		Кабата/Чотиа)

$ m B$ арианты $ m V_H$ или $ m V_L$	Экзонная акцепторная	Изменения в остатках
	последовательность $V_{H}$ или	акцепторных каркасов
	$ m V_L$	(на основе CDR
		совмещенной системе
		нумерации
		Кабата/Чотиа)
гум18C5-VH_v1 (SEQ ID	Акцептор 5VZY-VH_huFrwk	Нет
NO:85)	(CreneFab) номер доступа	
	5VZY (SEQ ID NO: 83)	
гум18C5-VH_v2 (SEQ ID	Акцептор 5VZY-VH_huFrwk	H37, H45, H47, H48,
NO: 86)	(CreneFab) номер доступа	H49, H94
	5VZY (SEQ ID NO: 83)	
гум18C5-VL_v1 (SEQ ID	Акцептор 5VZY-VL_huFrwk	Нет
NO: 91)	(CreneFab) номер доступа	
	5VZY (SEQ ID NO: 89)	
гум18C5-VL_v2 (SEQ ID	Акцептор 5VZY-VL_huFrwk	L2, L45
NO: 92)	(CreneFab) номер доступа	
	5VZY (SEQ ID NO: 89)	

Таблица 9

Нумерация по Кабату каркасных остатков (на основе CDR совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в тяжелых цепях гуманизированных антител 18С5

№ остатка по Кабату	(CreneFab) номер доступа 5VZY (SEQ ID NO: 83)	VH 18C5 мыши (SEQ ID NO: 81)	гум18С5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	гум18С5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
H37	V	A	V	A
H45	L	A Q W	L	A Q
H47	L		L	W
H48	V	I	V	I
H49	A	G	A	G
H94	S	R	S	R

Таблица 10

Нумерация по Кабату каркасных остатков (на основе CDR совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа) для обратных мутаций и других мутаций в легких цепях гуманизированных антител 18С5

Таблица 11 Процент гуманизации тяжелых и легких цепей гуманизированных антител 18C5

$oxed{Bapuahtы} V_{H}$ 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%

[0374] 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 Н48 по Кабату в Таблицах 6 и 7. Примеры остатков поверхности интерфейса/укладки (VH+VL) включают в себя остатки Н35, Н37, Н39, Н45, Н47, Н91, Н93, Н95, Н103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, и L98 по Кабату в Таблицах 6 и 7.

[0375] Обоснование выбора позиций, указанных в Таблице 6 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.

[0376] *гум18С5-VL*\_v1: Петли CDR-L1, L2, и L3 18С5-VL встроены в каркас CreneFab (5VZY-VL).

[0377] гум18С5-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; гум18С5-VL\_v2 содержит обратные мутации I2V акцептора человека на мутацию Q45R зародышевой линии, что позволяет оценить вклад этих позиций в аффинность связывания антигена и иммуногенность.

[0378] Вариабельные области легкой цепи:

[0379] rym18C5-VL 1 (SEQ ID NO: 91)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0380] rym18C5-VL 2 (SEQ ID NO: 92)

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0381] Обоснование выбора позиций, указанных в Таблице 7 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 мышином 18С5 Тгр находится в позиции 47, и Тгр 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.

А49G: представляет собой обратную мутацию остатка зоны Вернье.

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

[0382] *гум18С5-VH*\_v1: Петли CDR-H1, H2 и H3 из 18С5-VH встроены в каркас VH CreneFab (5VZY-VH).

[0383] *гум18С5-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. 18С5-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.

[0384] Вариабельные области тяжелой цепи:

[0385] rym18C5-VH 1 (SEQ ID NO: 85)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWVRQAPGKGLELVAEINPGSSTIN YTPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGTT VTVSS

[0386] rym18C5-VH 2 (SEQ ID NO: 86)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPGSSTIN YTPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTT VTVSS

Перечень последовательностей:

Аминокислотная последовательность VH 18C5 с сигнальным пептидом MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAP GRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGY GNYGWALDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 2

нуклеотидная последовательность, кодирующая VH 18C5 мыши с сигнальным пептидом

ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTCATTGTTGCCCTTTTAAAAGGGGTCCAGTGTGAGGT
AAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAATCTCTC
CTGTGTAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGTTGGGCTCGGCAGGCT
CCAGGGAGAGGACAGGAATGGATTGGAGAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAA
CTATACGCCATCTCTGAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACG
CTGTTCCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACTCAGCCCTTTATTACTGTGCAA
GACTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAG
TCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 3

Аминокислотная последовательность VL 18C5 с сигнальным пептидом MKLPVRLLVLMFWIPASRSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLT FGAGTKLELK

SEQ ID NO: 4

нуклеотидная последовательность, кодирующая VL 18C5 мыши с сигнальным пептидом

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGAAGTG
ATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTC
CATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAT
GGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACC
GATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACAC
TCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTC
ACATGTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGTTGGAGCTGAAA

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

AGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAA

SEQ ID NO: 13

аминокислотная последовательность CDR-L2 18C5

**KVSNRFS** 

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-L2 18C5

## AAAGTTTCCAACCGATTTTCT

SEQ ID NO: 15

аминокислотная последовательность CDR-L3 18C5

**FQGSHVPLT** 

SEQ ID NO: 16

нуклеотидная последовательность, кодирующая CDR-L3 18C5

## TTTCAAGGTTCACATGTTCCGCTCACG

SEQ ID NO: 17

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 18

нуклеотидная последовательность химерной константной области тяжелой цепи 18С5 (IgG1 человека)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG

AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGGCTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTTCCACACACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 19

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

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность химерной константной области легкой цепи 18С5 (каппа человека) СGGGGAACTGTGGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 21

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи G1m3 IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23

аминокислотная последовательность иллюстративной константной области тяжелой цепи  $G1m3 \ IgG1$ 

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 24

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

 $RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ\\ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC$ 

SEQ ID NO: 25

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

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 26

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

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADD TWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDS GPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 27

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

GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLT TEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTA VVTNPKE

SEQ ID NO: 28

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

 $\label{thm:continuous} GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLT\\ TEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTA\\ VVTNPKE$ 

SEQ ID NO: 29

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

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADD TWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDS GPRRYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 30

аминокислотная последовательность остатков 101-109 транстиретина человека GPRRYTIAA

SEQ ID NO: 31

аминокислотная последовательность остатков 87-127 транстиретина человека FHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO: 32

нуклеотидная последовательность, кодирующая иллюстративную константую область тяжелой цепи G1m3 IgG1

GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGACCAGCTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG

ACAAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGGCCACAGGACCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAACCACCACACCAC
GAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 33

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

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG
AGCAGGACAGCAAGGACACCACCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 34

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

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC
AGGACAGCAAGGACACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 35

аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области тяжелой цепи

MNFGLSLIFLVLVLKGVQC

нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области тяжелой цепи

### ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGT

SEQ ID NO: 37

аминокислотная последовательность сигнального пептида константной области легкой цепи

**MESHTQVFVFVFLWLSGVDG** 

SEQ ID NO: 38

нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид константной области легкой цепи

## ATGGAGTCACATACTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTTGACGG A

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

## RSNKSLLHSNGNTYLY

SEQ ID NO: 43

аминокислотная последовательность CDR-L2 по Кабату 14G8

## **RVSNLAS**

аминокислотная последовательность CDR-L3 по Кабату 14G8

**MQHLEYPLT** 

SEQ ID NO: 45

эпитоп 5А1

**EHAEVVFTA** 

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** 

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

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWIRQTPDKRLEWVATISSSGTYTYY
TESVKGRFTVSRDNAKNTLSLQMSNLKSDDTAMYYCTRQAYGREYFDVWGTGTTVTV
SSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQ
SGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPA
PNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVRISWFVNNVEVHTAQTQT
HREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILP
PPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLDI
KTSTVGENRFLLMQRETRGSEKLLPEEDHLPSPGK

SEQ ID NO: 59

аминокислотная последовательность области VL AD7F6
DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFDSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASN

RESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFCKQSNYLRTFGGGTRVEIKRADAAPTV

# SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

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

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** 

аминокислотная последовательность CDR-H3 по Кабату антитела 9D5 HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 78

аминокислотная последовательность CDR-L1 по Кабату антитела 9D5

RSSKSLLHSNGNTYLY

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

EVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAPGRGQEWIGEINPGSSTIN YTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTSV TVSS

SEQ ID NO: 82

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела Fab с №17 анти-пироглутамат-Абета мыши

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYSI YYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARYDYDNILDYVMDYWGQG TSVTVSS

SEQ ID NO: 83

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTY YPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTTVTVSS

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

SEQ ID NO: 85

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18С5 - гум18С5-VH\_1.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWVRQAPGKGLELVAEINPGSSTIN YTPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGTT VTVSS

SEQ ID NO: 86

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 18С5 - гум18С5-VH\_2.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPGSSTIN YTPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTT VTVSS

SEQ ID NO: 87

аминокислотная последовательность зрелой вариабельной области легкой цепи антитела 18C5 мыши

 $DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF\\ SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK$ 

SEQ ID NO: 88

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела Fab с №17 анти-пироглутамат-Абета мыши

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK

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

SEQ ID NO: 90

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

SEQ ID NO: 91

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL\_1

SEQ ID NO: 92

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела 18C5 - гум18C5-VL 2

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS 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

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

SEQ ID NO: 97

аминокислотная последовательность ATM CDR-H2 антитела 18C5 мыши EINPGSSTIN

SEQ ID NO: 98

аминокислотная последовательность контакта CDR-H2 антитела 18C5 мыши WIGEINPGSSTIN

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 LLIYKVSNRF

SEQ ID NO: 102

аминокислотная последовательность контакта CDR-L3 антитела 18C5 мыши FQGSHVPL

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенное моноклональное антитело, которое конкурирует за связывание с транстиретином человека (TTP) с моноклональным антителом 18C5.
- 2. Антитело по п. 1, которое связывается с тем же эпитопом на TTP человека, что и моноклональное антитело 18С5.
- 3. Антитело по п. 1, содержащее три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи моноклонального антитела 18С5, причем 18С5 представляет собой антитело мыши, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 81, и зрелой вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87.
- 4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что три CDR тяжелой цепи представляют собой такие, как определено по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 5, 7 и 9), и три CDR легкой цепи представляют собой такие, как определено по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа (SEQ ID NO: 11, 13, и 15).
- 5. Антитело по п. 1, которое представляет собой 18С5 или его химерную, венированную или гуманизированную форму.
- 6. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом в пределах позиций 101-109 в зрелой области SEQ ID NO: 26.
- 7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой моноклональное антитело.
- 8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой химерное, гуманизированное, венированное или человеческое антитело.
- 9. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет ≥ 85% идентичности с последовательностью человека.
- 10. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область легкой цепи имеет  $\geq 85\%$  идентичности с последовательностью человека.
- 11. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что каждая зрелая вариабельная область тяжелой цепи и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет ≥ 85% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека.
- 12. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело представляет собой гуманизированное антитело.

- 13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что имеет изотип IgG1 человека.
- 14. Антитело по любому из п. 1-13, отличающееся тем, что имеет изотип IgG2 или IgG4 человека.
- 15. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что представляет собой гуманизированное или химерное антитело 18С5, которое специфически связывается с транстиретином, причем 18С5 представляет собой антитело мыши, характеризующееся зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 81 и зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 87.
- 16. Гуманизированное антитело по п. 15, содержащее гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи 18С5, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи 18С5.
- 17. Гуманизированное антитело по п. 16, отличающееся тем, что CDR соответствуют определению, выбранному из группы, состоящей из определений: по Кабату, по Чотиа, по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа, АтМ, и контакта.
- 18. Гуманизированное антитело по п. 17, отличающееся тем, что гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа 18С5 (SEQ ID NO: 5, 7 и 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по совмещенной системе нумерации Кабата/Чотиа 18С5 (SEQ ID NO: 11, 13 и 15).
- 19. Гуманизированное антитело по п. 17, отличающееся тем, что гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Кабату 18C5 (SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Кабату 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15).
- 20. Гуманизированное антитело по п. 17, отличающееся тем, что гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по Чотиа 18C5 (SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по Чотиа 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15).
- 21. Гуманизированное антитело по п. 17, отличающееся тем, что гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по AтM 18C5 (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 97 и SEQ ID NO: 9), а гуманизированная

зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по AтM 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15).

- 22. Гуманизированное антитело по п. 17, отличающееся тем, что гуманизированная зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи по определению контакта 18C5 (SEQ ID NO: 100-102), а гуманизированная зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR легкой цепи по определению контакта 18C5 (SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99).
- 23. Гуманизированное антитело по любому из п. 15-22, содержащее гуманизированную зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и гуманизированную зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92.
- 24. Гуманизированное антитело по п. 23, отличающееся тем, что 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, а H94 занята S или R.
- 25. Гуманизированное антитело по п. 24, при условии, что позиции Н37, Н45, Н47, Н48, Н49 и Н94 в области VH заняты A, Q, W, I, G и R, соответственно.
- 26. Гуманизированное антитело по п. 23, отличающееся тем, что по меньшей мере одна из следующих позиций занята аминокислотой, как указано: L2 занята I или V, а L45 занята Q или R.
- 27. Гуманизированное антитело по п. 26, при условии, что позиции L2 и L45 в области VL заняты V и R, соответственно.
- 28. Гуманизированное антитело по п. 23, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92.
- 29. Гуманизированное антитело по п. 28, содержащее зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 98% идентичную любой из SEQ ID NO: 91-92.

- 30. Гуманизированное антитело по п. 29, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85-86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 91-92.
- 31. Гуманизированное антитело по п. 30, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 91.
- 32. Гуманизированное антитело по п. 30, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 92.
- 33. Гуманизированное антитело по п. 30, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 91.
- 34. Гуманизированное антитело по п. 30, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и зрелая вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 92.
- 35. Антитело по любому из п. 1-34, которое представляет собой интактное антитело.
- 36. Антитело по любому из п. 1-34, которое представляет собой связывающий фрагмент.
- 37. Антитело по п. 36, отличающееся тем, что связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, Fab, или фрагмент Fab'2.
- 38. Гуманизированное антитело по любому из п. 15-35, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, и зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи.
- 39. Гуманизированное антитело по п. 38, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области тяжелой цепи человека, которая имеет уменьшенное связывание с рецептором Fcy относительно природной константной области тяжелой цепи человека.
- 40. Гуманизированное антитело по п. 38 или 39, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1.

- 41. Гуманизированное антитело по п. 38, отличающееся тем, что зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 22, и/или зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 24.
- 42. Фармацевтическая композиция, содержащая первое антитело по любому из предыдущих пунктов, второе антитело, которое связывается с эпитопом ТТР, отличающимся от того, с которым связывается 18С5, и фармацевтически приемлемый носитель.
- 43. Фармацевтическая композиция по п. 42, отличающаяся тем, что второе антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или их химерный вариант или гуманизированный вариант.
- 44. Фармацевтическая композиция по п. 42, отличающаяся тем, что второе 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 TTP.
- 45. Биспецифическое антитело, содержащее две антиген-связывающие области, первый антиген-связывающий домен, который специфически связывается в пределах 101-109 TTP, и второй антиген-связывающий домен, который специфически связывается с другой областью TTP.
- 46. Биспецифическое антитело по п. 45, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий домен представляет собой антиген-связывающий домен из 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или их химерного варианта или гуманизированного варианта.
- 47. Биспецифическое антитело по п. 45, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий домен 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 TTP.
- 48. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из п. 1-41 и 45-47, и фармацевтически приемлемый носитель.
- 49. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела, как описано в любом из п. 1-41 и/или 45-47.
- 50. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 49.

- 51. Клетка-хозяин, трансформированная рекомбинантным вектором экспрессии по п. 50.
  - 52. Способ гуманизации антитела, включающий в себя:
  - (а) выбор акцепторного антитела человека;
- (b) идентификацию аминокислотных остатков антитела мыши, которые должны быть сохранены;
- (c) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированную тяжелую цепь, содержащую CDR тяжелой цепи антитела мыши, и нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированную легкую цепь, содержащую CDR легкой цепи антитела мыши; и
- (d) экспрессию нуклеиновых кислот в клетке-хозяине для получения гуманизированного антитела;

при этом антитело мыши содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и зрелую вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

- 53. Способ получения гуманизированного, химерного или венированного антитела, включающий в себя:
- (а) культивирование клеток, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела, так что клетки секретируют антитело; и
  - (b) очистку антитела от среды для культивирования клеток;

при этом антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 18C5.

- 54. Способ получения клеточной линии, продуцирующей гуманизированное, химерное или венированное антитело, включающий в себя:
- (а) введение вектора, кодирующего тяжелые и легкие цепи антитела и маркера селекции, в клетки;
- (b) размножение клеток в условиях для осуществления отбора клеток, имеющих увеличенное количество копий вектора;
  - (с) выделение отдельных клеток из отобранных клеток; и
- (d) депонирование клеток, клонированных из одной клетки, отобранной исходя из выхода антитела;

при этом антитело представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму 18C5.

55. Способ по п. 54, дополнительно включающий в себя размножение клеток в условиях отбора, и скрининг на клеточные линии, естественно экспрессирующие и секретирующие по меньшей мере  $100 \text{ мг/л}/10^6 \text{ клеток/24 ч.}$ 

- 56. Способ ингибирования или уменьшения агрегации транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47, тем самым ингибируя или уменьшая агрегацию транстиретина у субъекта.
- 57. Способ ингибирования или уменьшения формирования фибрилл транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47, тем самым ингибируя или уменьшая формирование фибрилл транстиретина у субъекта.
- 58. Способ уменьшения отложений или агрегатов транстиретина у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47, тем самым уменьшая отложения транстиретина у субъекта.
- 59. Способ удаления транстиретинового амилоида у субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретинопосредованного амилоидоза, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47, тем самым удаляя транстиретиновый амилоид у субъекта, относительно субъекта, имеющего транстиретин-опосредованный амилоидоз или имеющего риск развития транстиретин-опосредованного амилоидоза, который не получает антитело.
- 60. Способ лечения или осуществления профилактики транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47.
- 61. Способ задержки начала проявления транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47.
- 62. Способ по любому из п. 56-61, отличающийся тем, что транстиретинопосредованный амилоидоз связан с патологией, выбранной из любого из: кардиомиопатии или гипертрофии, наследственной амилоидной полинейропатии, селективного амилоидоза центральной нервной системы (АЦНС), старческого системного амилоидоза, старческого сердечного амилоидоза, стеноза позвоночника, остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, возрастной макулярной дегенерации, и нарушения связок или сухожилий.

- 63. Способ лечения субъекта, имеющего или имеющего риск кардиомиопатии или гипертрофии, наследственной амилоидной полинейропатии, селективного амилоидоза центральной нервной системы (АЦНС), старческого системного амилоидоза, старческого сердечного амилоидоза, стеноза позвоночника, остеоартрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, возрастной макулярной дегенерации, и нарушения связок или сухожилий, включающий в себя введение субъекту по эффективной схеме антитела по любому из п. 1-41 и 45-47.
- 64. Способ по любому из п. 56-63, отличающийся тем, что антитело вводят в комбинации со вторым антителом, которое связывается с эпитопом TTP, отличающимся от того, с которым связывается 18С5.
- 65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что второе антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114 или их химерную или гуманизированную форму.
- 66. Способ по п. 64, отличающийся тем, что второе антитело 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, 100-127, 110-127 или 115-127 TTP.
- 67. Способ по любому из п. 56-63, отличающийся тем, что антитело вводят в виде монотерапии.
- 68. Способ диагностики транстиретин-опосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта с эффективным количеством антитела по любому из п. 1-41.
- 69. Способ по п. 68, дополнительно включающий в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта с эффективным количеством второго антитела, которое связывается с эпитопом TTP, отличающимся от того, с которым связывается 18C5.
- 70. Способ по п. 48, отличающийся тем, что второе антитело представляет собой 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, или их химерную или гуманизированную форму.
- 71. Способ по п. 69, отличающийся тем, что второе антитело 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 TTP.

- 72. Способ по любому из п. 68-71, дополнительно включающий в себя обнаружение связывания антитела с транстиретином, при этом присутствие связанного антитела указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.
- 73. Способ по любому из п. 68-71, дополнительно включающий в себя сравнение связывания антитела с биологическим образцом, с связыванием антитела с контрольным образцом, причем увеличенное связывание антитела с биологическим образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на то, что субъект имеет транстиретин-опосредованный амилоидоз.
- 74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки одного и того же тканевого происхождения.
- 75. Способ по любому из п. 68-74, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань.
- 76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что твердую ткань берут из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз, брюшного жира, или желудочно-кишечного тракта.
- 77. Способ по любому из пп. 56-76, отличающийся тем, что транстиретинопосредованный амилоидоз представляет собой наследственный транстиретиновый амилоидоз или спорадический транстиретиновый амилоидоз.
- 78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что наследственный транстиретиновый амилоидоз представляет собой наследственную амилоидную кардиомиопатию (НАК), наследственную амилоидную полинейропатию (НАП) или селективный амилоидоз центральной нервной системы (АЦНС).
- 79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что спорадический транстиретиновый амилоидоз представляет собой старческий системный амилоидоз (ССА) или старческий сердечный амилоидоз (ССерА).
- 80. Способ по любому из п. 56-79, отличающийся тем, что транстиретинопосредованный амилоидоз связан с накоплением амилоида в сердце, периферической нервной системе, вегетативной нервной системе, почках, глазах, брюшном жире или желудочно-кишечном тракте субъекта.
- 81. Способ обнаружения присутствия или отсутствия отложений транстиретина у субъекта, включающий в себя приведение в контакт биологического образца от субъекта, предположительно содержащего скопление амилоида, с эффективным количеством антитела по любому из п. 1-41.

- 82. Способ по п. 81, дополнительно включающий в себя обнаружение связывания антитела с транстиретином, причем обнаружение связанного антитела указывает на наличие отложений транстиретина.
- 83. Способ по. 81 или 82, дополнительно включающий в себя сравнение связывания антитела с биологическим образцом, с связыванием антитела с контрольным образцом, причем увеличенное связывание антитела с биологическим образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на то, что субъект имеет транстиретинопосредованный амилоидоз.
- 84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что биологический образец и контрольный образец содержат клетки одного и того же тканевого происхождения.
- 85. Способ по любому из п. 81-83, отличающийся тем, что биологический образец и/или контрольный образец представляет собой кровь, сыворотку, плазму или твердую ткань.
- 86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что твердую ткань берут из сердца, периферической нервной системы, вегетативной нервной системы, почек, глаз, брюшного жира, или желудочно-кишечного тракта.
- 87. Способ определения уровня отложений транстиретина у субъекта, включающий в себя введение антитела по любому из п. 1-48 и обнаружение присутствия связанного антитела у субъекта.
- 88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что присутствие связанного антитела определяют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).
- 89. Способ лечения или осуществления профилактики транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение по эффективной схеме стабилизатора тетрамера ТТР, терапевтического агента на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтического агента на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклина и тауроурсодезоксихолевой кислоты, при этом субъекта до этого лечили антителом по любому из п. 1-41 и 45-47.
- 90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что субъект больше не получает лечение указанным антителом.
- 91. Способ по п. 89, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера TTP представляет собой тафамидис или дифлунизал.
- 92. Способ по п. 89, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.
- 93. Способ по п. 89, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.

- 94. Способ по любому из п. 56-63, отличающийся тем, что антитело вводят в комбинации с стабилизатором тетрамера ТТР, терапевтическим агентом на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтическим агентом на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой.
- 95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.
- 96. Способ по п. 94, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.
- 97. Способ по п. 94, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.
- 98. Способ по любому из п. 56-63, отличающийся тем, что антитело вводят одновременно с стабилизатором тетрамера ТТР, терапевтическим агентом на основе антисмыслового олигонуклеотида, терапевтическим агентом на основе РНК-интерференции (РНКи), или доксициклином и тауроурсодезоксихолевой кислотой.
- 99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой тафамидис или дифлунизал.
- 100. Способ по п. 98, отличающийся тем, что стабилизатор тетрамера ТТР представляет собой дифлунизал.
- 101. Способ по п. 98, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой инотерсен.
- 102. Способ по п. 98, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе РНКи представляет собой патизиран или ревузиран.
- 103. Способ идентификации антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP, включающий в себя:
  - (а) иммунизацию животного ТТР или его фрагментом; и
- (b) скрининг индуцированных антител для выявления связывания антител в пределах остатков 101-109 TTP.
- 104. Способ по п. 103, отличающийся тем, что иммунизацию выполняют фрагментом из не более чем 25 смежных остатков TTP, включая по меньшей мере 3 смежных остатка в пределах остатков 101-109 TTP.
- 105. Способ по п. 103, отличающийся тем, что фрагмент состоит из остатков 101-109 TTP, необязательно соединенных с носителем.
- 106. Способ по п. 103, отличающийся тем, что скрининг выполняют путем определения связывания антител с фрагментом TTP, состоящим из остатков 101-109 TTP.

107. Способ идентификации антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP, включающий в себя:

предоставление дисплей-библиотеки антител; и

скрининг дисплей-библиотеки для идентификации связывания антитела в пределах остатков 101-109 TTP.

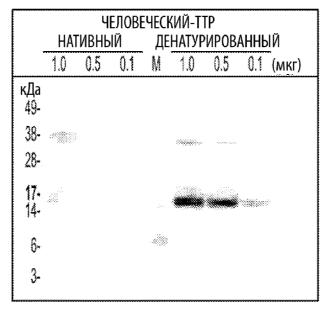
- 108. Способ по п. 107, отличающийся тем, что дисплей-библиотека экспонирует антитела в виде фрагментов Fv.
- 109. Способ по п. 107, отличающийся тем, что дисплей-библиотека представляет собой наивную дисплей-библиотеку.
- 110. Способ по п. 107, отличающийся тем, что дисплей-библиотеку получают путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор.
- 111. Способ по п. 107, отличающийся тем, что скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с фрагментом TTP, состоящим из остатков 101-109.
- 112. Способ по п. 107, отличающийся тем, что скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с TTP в присутствии контрольного антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP.
- 113. Способ по п. 112, отличающийся тем, что контрольное антитело представляет собой 18С5.
- 114. Способ идентификации антитела, которое конкурирует за связывание с антителом 18C5 за связывание с TTP, включающий в себя:

приведение в контакт TTP с антителом в присутствии и отсутствии антитела 18С5, и определение связывания антитела с TTP, причем уменьшенное связывание в присутствии антитела 18С5 указывает на то, что антитело конкурирует с антителом 18С5 за связывание с TTP.

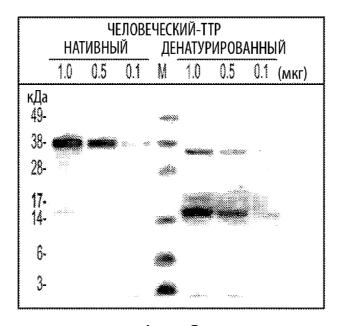
- 115. Способ идентификации антитела, которое связывается с тем же эпитопом что и антитело 18C5 на TTP, включающий в себя:
  - (а) определение эпитопа, связанного антителом 18С5 на ТТР;
  - (b) иммунизацию животного ТТР или его фрагментом; и
- (c) скрининг индуцированных антител для идентификации связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18C5.
- 116. Способ по п. 115, отличающийся тем, что эпитоп, связанный антителом 18С5 на TTP, определяют с помощью мутагенеза TTP.

- 117. Способ по п. 115, отличающийся тем, что эпитоп, связанный антителом 18С5 на TTP, определяют с помощью рентгеновской кристаллографии.
- 118. Способ идентификации антитела, которое связывается с тем же эпитопом что и антитело 18С5 на ТТР, включающий в себя:
  - (а) определение эпитопа, связанного антителом 18С5 на ТТР;
  - (b) предоставление дисплей-библиотеки антител; и
- (c) скрининг дисплей-библиотеки для идентификации связывания антитела с тем же эпитопом, что и антитело 18С5.
- 119. Способ по п. 118, отличающийся тем, что эпитоп, связанный антителом 18С5 на ТТР, определяют с помощью мутагенеза ТТР.
- 120. Способ по п. 118, отличающийся тем, что эпитоп, связанный антителом 18C5 на TTP, определяют с помощью рентгеновской кристаллографии.
- 121. Способ по п. 118, отличающийся тем, что дисплей-библиотека экспонирует антитела в виде фрагментов Fv.
- 122. Способ по п. 118, отличающийся тем, что дисплей-библиотека представляет собой наивную дисплей-библиотеку.
- 123. Способ по п. 118, отличающийся тем, что дисплей-библиотеку получают путем иммунизации грызуна ТТР или его фрагментом, и клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в дисплей-вектор.
- 124. Способ по п. 118, отличающийся тем, что скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с фрагментом TTP, состоящим из остатков 101-109.
- 125. Способ по п. 118, отличающийся тем, что скрининг выполняют путем определения связывания членов библиотеки с TTP в присутствии контрольного антитела, которое связывается с эпитопом в пределах остатков 101-109 TTP.
- 126. Способ по п. 125, отличающийся тем, что контрольное антитело представляет собой 18С5.
- 127. Способ по п. 118, в котором каждый член дисплей-библиотеки экспонирует одну и ту же вариабельную область легкой цепи, и отличающуюся вариабельную область тяжелой цепи.
- 128. Способ по п. 127, в котором вариабельная область легкой цепи представляет собой вариабельную область легкой цепи антитела 18С5.
- 129. Способ по п. 127, в котором вариабельную область тяжелой цепи получают из библиотеки перестроенных вариабельных областей тяжелой цепи человека.

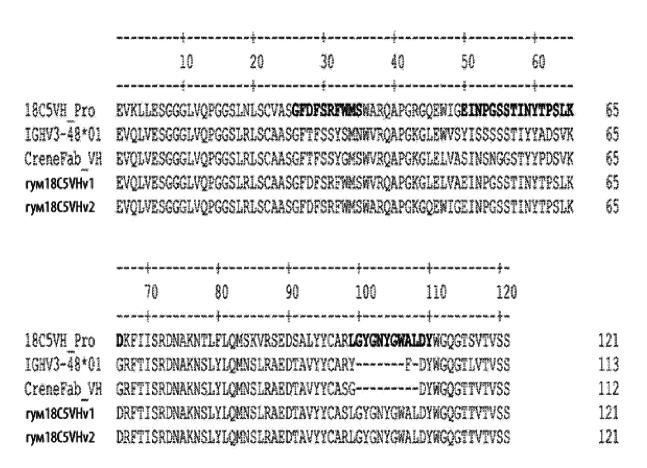
- 130. Способ по п. 118, в котором каждый член дисплей-библиотеки экспонирует одну и ту же вариабельную область тяжелой цепи, и отличающуюся вариабельную область легкой цепи.
- 131. Способ по п. 130, в котором вариабельная область тяжелой цепи представляет собой вариабельную область тяжелой цепи антитела 18С5.
- 132. Способ по п. 131, в котором вариабельную область легкой цепи получают из библиотеки перестроенных вариабельных областей легкой цепи человека.
- 133. Способ лечения или осуществления профилактики транстиретинопосредованного амилоидоза у субъекта, включающий в себя введение иммуногена, содержащего пептид ТТР из вплоть до 20 смежных аминокислот ТТР, с которым специфически связывается антитело 18С5, при этом пептид отдельно и/или когда он связан с гетерологичным носителем, индуцирует формирование антител, специфически связывающихся с ТТР у субъекта.
- 134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что указанный иммуноген содержит эпитоп, с которым специфически связывается антитело 18С5.
- 135. Способ по п. 133, отличающийся тем, что указанный иммуноген содержит пептид TTP из вплоть до 20 смежных аминокислот из остатков 89-127 TTP.
- 136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что указанный иммуноген содержит пептид TTP из вплоть до 11 смежных аминокислот из остатков 100-110 TTP.
- 137. Способ по п. 136, отличающийся тем, что указанный иммуноген содержит пептид TTP из вплоть до 9 смежных аминокислот из остатков 101-109 TTP.
- 138. Способ по п. 134, отличающийся тем, что указанный пептидный эпитоп TTP состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 89-127 TTP.
- 139. Способ по п. 138, отличающийся тем, что указанный пептидный эпитоп TTP состоит из 4-11 смежных аминокислот из остатков 100-110 TTP.
- 140. Способ по п. 139, отличающийся тем, что указанный пептидный эпитоп TTP состоит из 4-9 смежных аминокислот из остатков 101-109 TTP.
- 141. Иммуноген, содержащий пептид TTP из вплоть до 20 смежных аминокислот из остатков 89-127 TTP, соединенных с гетерологичным носителем, который помогает выработке антител против указанного пептида TTP.



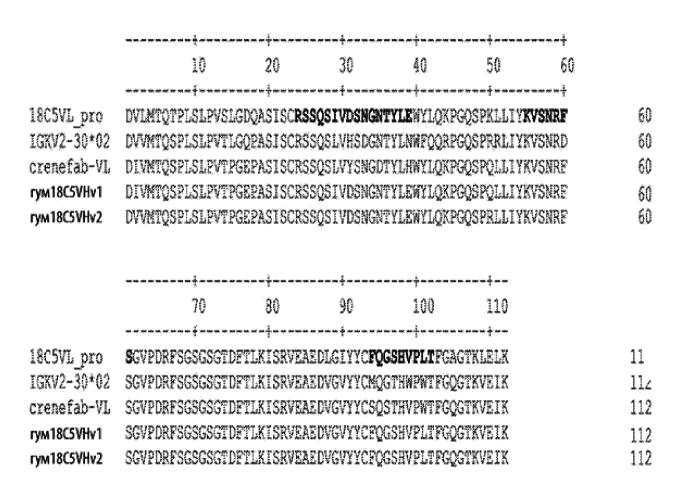
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4